

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAUREN ISFER ANGHEBEM-OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES E VARIANTES GENÉTICAS NO *DIABETES*
MELLITUS TIPO 1, TIPO 2 E GESTACIONAL**

CURITIBA

2015

MAUREN ISFER ANGHEBEM-OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES E VARIANTES GENÉTICAS NO *DIABETES MELLITUS* TIPO 1, TIPO 2 E GESTACIONAL

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Fabiane Gomes de Moraes Rego**

**Co-orientador:
Prof. Dr. Geraldo Picheth**

CURITIBA

2015

Anghebem-Oliveira, Mauren Isfer

Avaliação de biomarcadores e variantes genéticas no *diabetes mellitus* tipo 1, tipo 2 e gestacional / Mauren Isfer Anghebem-Oliveira – Curitiba, 2015.
152 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Diabetes mellitus*. 2. Biomarcadores. 3. Polimorfismos. 4. sRAGE. 5. esRAGE.
I. Rego, Fabiane Gomes de Moraes. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.462

TERMO DE APROVAÇÃO

MAUREN ISFER ANGHEBEM-OLIVEIRA

Título: “Avaliação de biomarcadores e variantes genéticas no diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 e gestacional”

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Prof.^a Dr.^a Fabiane Gomes de Moraes Rego
Orientadora


Prof. Dr. Geraldo Picheth
Co-orientador


Dr.^a Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita
Pontifícia Universidade Católica do Paraná


Prof.^a Dr.^a Marileia Scartezini
Universidade Federal do Paraná


Prof.^a Dr.^a Dayane Alberton
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 17 de junho de 2015.

AGRADECIMENTO

No silêncio deste momento em que paro para pensar sobre as pessoas a quem devo agradecer pelo meu doutorado, tive vontade de rezar! Rezar para mostrar gratidão, pois compartilho da filosofia de Cícero: "Nenhum dever é mais importante do que a gratidão".

E por ser tão grata é que rezo para Deus, para agradecer pelas oportunidades que tenho tido na vida; mas, sobretudo, pelas pessoas que contribuíram para que eu estivesse neste exato momento.

Sempre fui determinada, mas algumas pessoas me fortaleceram e me influenciaram de forma marcante, e a primeira delas talvez seja minha avó Nilse. Agradeço ao Senhor, por ainda tê-la em minha vida! Ela, juntamente com minha mãe, Denise, desde cedo me incentivaram a seguir por um caminho que me interessava, o do conhecimento.

Agradeço à minha família (irmãs e irmão, tios e tias, primos e primas, pai) pelo conforto do "lugar seguro".

Sou muito grata pelo maior amor da minha vida, Marina. Peço, Senhor, que esteja com ela em todos os momentos. Ela mudou a minha vida para melhor desde o momento em que foi concebida, e a cada dia mais. Apenas a sua presença fez toda a diferença nos momentos mais complicados.

Obrigada pela pessoa que na vida vai comigo agora. Júlio! Ele é especial e me faz muito feliz. Permita que eu possa retribuir a altura.

Ir atrás do que se quer só depende da nossa vontade. Mas conquistar o que se desejou depende de muitos, e é por isso meu Deus, que sou grata a tantas pessoas que transformaram minha vida.

Agradeço ao Prof Geraldo Picheth, por ter aceitado orientar minha monografia de especialização há mais de 10 anos (2003), e, desde aquele momento, ter me incentivado a trilhar o caminho que tenho percorrido até aqui. Deus, abençoe a vida dessa pessoa que é tão especial para mim, como é para tantos outros com quem convive diariamente no Laboratório de Bioquímica. Ele é a diretriz de todos nós.

Não posso deixar de pensar na Prof^a. Dr^a. Marileia, que cruzou comigo no mundo acadêmico, e passou a ser uma querida amiga. Ela me ensinou além dos livros; ela mostrou que a vida é feita de redes de contatos, e que o sorriso é uma ferramenta preciosa.

A vida, em sua eterna reciclagem, me trouxe uma surpresa, e todas as surpresas são obras abençoadas pela Sua essência. Então, meu mais especial agradecimento é para a Prof^a. Dr^a. Fabiane Rego. Uma pessoa genial, motivada e competente. Obrigada por ela aceitar me orientar nesse desafio e se tornar mais que uma orientadora, uma amiga. Aprendi muito nesta caminhada. Ela merecia uma aluna tão comprometida quanto ela, mas fico feliz por ter sido eu a primeira de muitas que estarão sob sua orientação!

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Dayane Alberton, alma doce que tem contribuído de tantas formas, que nem sequer imagina.

Obrigada aos professores e grupos de pesquisa que contribuíram com suporte técnico e financeiro (Prof^a. Aline, Prof Railson, Prof^a. Cyntia, e especial obrigada ao Prof Emanuel); e técnicos da Bioquímica do Politécnico e da Bioquímica do Botânico, que auxiliaram com a estrutura e material de apoio.

Agradeço pelos colegas que trilharam e ainda trilham os mesmos caminhos que eu, e foram importantes pela ajuda braçal, pela amizade, pelas conversas e piadas, ou simplesmente pela companhia nas madrugadas de experimentos. Rafaela, Larissa, Priscila, Karla, Samia, Petra, Débora, Letícia, Sandra, Luana, Daniela, Ademir, João Paulo. Katia, amiga de longa data. Especial obrigada pelo convívio diário com a Claudia e Marciane; e às mais recentes integrantes do grupo de pesquisa, Luiza e Adriana, Bruna, Catiane e Susan. Obrigada à Izabella, Henrique, Gabriel e Waldemar, amigos e companheiros de caminhada desde a época do mestrado.

Os proteja Senhor, pois eles têm papel importante nesta conquista. Como disse Saint-Exupéry, cada um que passa em nossas vidas, leva um pouco de nós mesmos, e deixa um pouco de si mesmo. Agradeço muito por essa troca!

Amém!

“Tudo deveria se tornar o mais simples possível, mas não simplificado”.

Albert Einstein

RESUMO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla e poligênica. A hiperglicemia crônica favorece a formação de produtos finais de glicação avançada, os AGEs (*Advanced Glycation End-products*). A interação AGE-RAGE (*receptor for AGE*), inicia uma cascata de processos pro-inflamatórios e pro-coagulantes que resultam em estresse oxidativo, base da disfunção endotelial envolvida nas complicações vasculares do DM. Isoformas solúveis de RAGE (sRAGE e esRAGE) têm sido apontadas como preditores de risco para estas complicações. Assim, a interação de fatores genéticos e ambientais na fisiopatologia do DM torna relevante a descoberta de biomarcadores e variantes genéticas que possam auxiliar no diagnóstico, monitoramento ou prognóstico da doença. O objetivo do trabalho foi investigar a presença e associação entre biomarcadores e variantes genéticas no DM tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e gestacional (DMG). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CAAE: 01038112.0.0000.0102). Neste estudo, 967 participantes foram subdivididos em grupos caso-controle: 100 DM1 e 117 controles saudáveis; 200 DM2 e 298 controles saudáveis; e, 127 DMG e 125 gestantes saudáveis. Biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, de inflamação e da função renal foram quantificados. Os polimorfismos rs17576 do gene *MMP9* e rs3134945 do gene *RAGE* foram genotipados nos grupos caso-controle DM1 e DM2, e os polimorfismos rs1421085 do gene *FTO*, rs780094 do gene *GCKR*, rs1137100 e rs1137101 do gene *LEPR*, rs1801282 do gene *PPARG* e rs7901695 do gene *TCF7L2*, no grupo caso-controle DMG. Um subgrupo de pacientes com DM2 e complicações vasculares (n=44) foi selecionado e pareado por gênero e idade com controles saudáveis (n=44). Neste subgrupo (n=88), foram quantificadas sRAGE e esRAGE através de ensaio imunoenzimático para verificar associação dessas isoformas com outros biomarcadores ou com as variantes rs17576 do *MMP9* e rs3134945 do *RAGE*. Todas as variantes estudadas estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. O polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* não foi associado ao DM1 (P=0,469) ou DM2 (P=0,269); assim como o rs3134945 do gene *RAGE* não está associado ao DM1 (P=0,162) ou DM2 (P=0,659) na população em estudo. Os polimorfismos rs1421085 do gene *FTO*, rs1137100 e rs1137101 do gene *LEPR*, rs1801282 do gene *PPARG* e rs7901695 do gene *TCF7L2* não foram associados ao DMG no presente estudo (P=0,420, P=0,687, P=0,228, P=0,851 e P=0,413, respectivamente). O polimorfismo rs780094 do gene *GCKR* foi associado ao DMG na população estudada, nos modelos codominante e dominante (P=0,022 e P=0,010, respectivamente), sendo o alelo T protetor (*Odds ratio* 1,41; 95%IC 0,97-2,03). Os polimorfismos em estudo não foram associados aos parâmetros antropométricos, clínicos e laboratoriais estudados. As concentrações séricas de sRAGE e esRAGE não diferem entre gêneros e não foram associadas ao DM2 ou com os polimorfismos rs17576 do *MMP9* e rs3134945 do *RAGE*; mas apresentaram correlação positiva e significativa (P<0,05) com a glicemia (r=0,335 e r=0,320, respectivamente) e com o 1,5 anidroglicitol (r=0,446 e r=0,563, respectivamente). Em conclusão, o gene *GCKR* é candidato à associação com DMG, e a presença do alelo T do polimorfismo rs780094 foi associada ao risco reduzido para o desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*, biomarcadores, polimorfismos, sRAGE, esRAGE.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a multifactorial and polygenic syndrome. The chronic hyperglycemia common in DM promotes the formation of Advanced Glycation End-products, AGEs. The interaction of AGEs with cellular receptor RAGE (receptor for AGE), initiates a cascade of pro-inflammatory and pro-coagulant processes which result in oxidative stress and endothelial dysfunction, basis of vascular complications. Thus, the soluble isoform of RAGE (sRAGE and esRAGE) have been identified as predictors of risk for DM complications. Because of the interaction of genetic and environmental factors in the DM pathophysiology it is relevant to search for serum or genetic biomarkers as tools for diagnosis, monitoring or prognosis of DM. The aim of this study was to investigate the association between serum biomarkers and genetic variants in type 1 DM (T1D), type 2 DM (T2D) and gestational diabetes (GDM). The study was approved by the Research Ethics Committee of the UFPR Health Sciences Sector (CAAE: 01038112.0.0000.0102). Were involved in this study 967 participants and the case-control groups were composed of 100 T1D and 117 healthy controls; 200 T2D and 298 healthy controls; and GDM 127 and 125 healthy pregnant women. Glycemic control biomarkers, lipid profile and inflammatory and renal function biomarkers were measured. The polymorphisms rs17576 of *MMP9* gene and rs3134945 of *RAGE* gene were genotyped in the case-control groups T1D and T2D, and we genotyped, in GDM case-control group, the polymorphisms rs1421085 of *FTO* gene, rs780094 of *GCKR* gene, rs1137100 and rs1137101 of *LEPR* gene, rs1801282 of *PPARG* gene and rs7901695 of *TCF7L2* gene. A set of T2D patients with vascular complications was selected and paired by gender and age with healthy controls. In this subgroup (n=88) we measured sRAGE and esRAGE by enzyme immunoassay to verify association with biomarkers or with the rs17576 and rs3134945 polymorphisms. All the studied variants were within the *Hardy-Weinberg* equilibrium. The rs17576 *MMP9* gene polymorphism was not associated with T1D ($P=0.469$) or T2D ($P=0.269$); as well as rs3134945 *RAGE* gene polymorphism was not associated with T1D ($P=0.162$) or T2D ($P=0.659$) in the study population. The polymorphisms rs1421085 of *FTO* gene, rs1137100 and rs1137101 of *LEPR* gene, rs1801282 of *PPARG* gene and rs7901695 of *TCF7L2* gene were not associated with GDM in this study ($P=0.420$, $P=0.687$, $P=0.228$, $P=0.851$ and $P=0.413$, respectively). The rs780094 *GCKR* gene polymorphism was associated with the GDM in the studied population, in codominant and dominant models ($P=0.022$ and $P=0.010$, respectively). We also observed the protective effect of T allele (odds ratio 1.41, 95%CI 0.97-2.03) in these patients. None of the studied polymorphisms were associated with anthropometric, clinical and laboratory parameters. Serum concentrations of sRAGE and esRAGE do not differ between genders and are not associated with T2D or with rs17576 of *MMP9* gene and rs3134945 of *RAGE* gene; but they showed a positive and significant correlation ($P < 0.05$) with glucose ($r=0.335$ and $r=0.320$, respectively) and with 1.5 anhydroglucitol ($r=0.446$ and $r=0.563$, respectively). In conclusion, the *GCKR* gene is a candidate for association with GDM, and the presence of the T allele of the rs780094 polymorphism was associated with reduced risk for the disease.

Key-words: *Diabetes mellitus*, biomarkers, polymorphisms, sRAGE, esRAGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global do diabetes.	19
Figura 2 – História natural do DM1.....	21
Figura 3 – História natural do DM2.....	23
Figura 4 – Critérios para o diagnóstico de <i>Diabetes mellitus</i> gestacional.	26
Figura 5 – Etapas da reação de <i>Maillard</i>	31
Figura 6 – Receptor RAGE e suas isoformas.....	35
Figura 7 – Localização e estrutura genômica do gene <i>FTO</i>	41
Figura 8 – Localização e estrutura genômica do gene <i>GCKR</i>	43
Figura 9 – Localização e estrutura genômica do gene <i>LEPR</i>	45
Figura 10 – Localização e estrutura genômica do gene <i>MMP9</i>	48
Figura 11 – Localização e estrutura genômica do gene <i>PPARg</i>	49
Figura 12 – Localização e estrutura genômica do gene <i>RAGE</i>	51
Figura 13 – Localização e estrutura genômica do gene <i>TCF7L2</i>	54
Figura 14 – Caracterização da amostra em estudo.....	57
Figura 15 – Fluxograma de trabalho.	64
Figura 16 – Comparação entre as concentrações de sRAGE e esRAGE entre os subgrupos de controles e DM2.....	103
Figura 17 – Distribuição das complicações vasculares no subgrupo DM2, por gênero.	104
Figura 18 – Classificação da amostra através da HbA1c, estratificada para diagnóstico do DM e quanto ao risco para desenvolver DM em cinco anos.	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE DIABETES E CARACTERIZAÇÃO DE RISCO AUMENTADO PARA DM.....	25
TABELA 2 – CARACTERÍSTICA DOS POLIMORFISMOS E DA REAÇÃO DE qPCR	59
TABELA 3 – CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA A REAÇÃO DE qPCR	59
TABELA 4 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS E VALORES DE REFERÊNCIA	61
TABELA 5 – CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DOS GRUPOS DM1 E CONTROLES.....	65
TABELA 6 – CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DOS GRUPOS DM2 E CONTROLES.....	66
TABELA 7 – CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DOS GRUPOS DMG E CONTROLES.....	67
TABELA 8 – CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS DM1 E CONTROLES	73
TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS DM2 E SEUS CONTROLES	74
TABELA 10 – CONCENTRAÇÕES E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA DMG E GESTANTES SAUDÁVEIS	75
TABELA 11 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs17576 DO GENE <i>MMP9</i> E rs3134945 DO GENE <i>RAGE</i> PARA OS GRUPOS DM1 E CONTROLES	84
TABELA 12 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs17576 DO GENE <i>MMP9</i> E rs3134945 DO GENE <i>RAGE</i> PARA OS GRUPOS DM2 E CONTROLES	85
TABELA 13 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE <i>MMP9</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	87
TABELA 14 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE <i>RAGE</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	89

TABELA 15 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS SNPS ESTUDADOS NO GRUPO DMG E GESTANTES SAUDÁVEIS.....	90
TABELA 16 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1421085 DO GENE <i>FTO</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	92
TABELA 17 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7800945 DO GENE <i>GCKR</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	93
TABELA 18 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1137100 DO GENE <i>LEPR</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	96
TABELA 19 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1137101 DO GENE <i>LEPR</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	97
TABELA 20 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1801282 DO GENE <i>PPARG</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	99
TABELA 21 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7901895 DO GENE <i>TCF7L2</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	101
TABELA 22 – COMPARAÇÕES ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE sRAGE E esRAGE NOS SUBGRUPOS COM DM2 E CONTROLES.....	102
TABELA 23 – COMPLICAÇÕES VASCULARES NO SUBGRUPO DM2 E CORRELAÇÕES COM OUTROS PARÂMETROS	104
TABELA 24 – CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE DOADORES DE SANGUE, CLASSIFICADOS POR GÊNERO.	107
TABELA 25 – PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E LABORATORIAIS ASSOCIADOS AOS GRUPOS EM ESTUDO	109
TABELA 26 – INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA GLICEMIA SEM JEJUM EM DOADORES DE SANGUE SAUDÁVEIS.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,5 AG	1,5 anidroglucitol
ADA	American Diabetes Association (Associação Americana de Diabetes)
AGEs	Advanced glycation end products (Produtos de glicação avançada)
CML	N-epsilon-carboximetil lisina
CVa	Coeficiente de variação analítica inter ensaio
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FTO	Fat mass and obesity associated gene (Gene associado à massa adiposa e obesidade)
GCKR	Glucokinase Receptor gene (Gene do receptor da glucoquinase)
GLP-1	Glucagon-like peptide 1 (Peptídeo 1 tipo glucagon)
HbA1c	Hemoglobina Glicada fração A1C
HDL-c	HDL- Colesterol (High Density Lipoprotein – Cholesterol)
HLA	Human Leukocyte Antigen (Antígeno leucocitário humano)
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IDF	International Diabetes Federation (Federação Internacional de Diabetes)
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL-c	LDL-Colesterol (Low Density Lipoprotein – Cholesterol)
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young, (Diabetes da maturidade de início precoce)
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program (Programa Nacional para Padronização da Hemoglobina Glicada)
OMIM	Mendelian Inheritance in Man (Herança Mendeliana no Homem Online)
P	Probabilidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Primers	Oligonucleotídeos iniciadores
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
rs	Reference sequence (Identificação dos polimorfismos de um único nucleotídeo)
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes

SEMPR	<i>Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de único nucleotídeo)</i>
TCF7L2	<i>Transcription factor 7-like 2 gene (Gene do fator de transcrição 7-semelhante a 2)</i>
TCLE	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>
TNF α	<i>Fator de necrose tumoral alfa</i>
TOTG	<i>Teste Oral de Tolerância à Glicose</i>
UDP-N-acetilglicosamina	<i>Uridina-Difosfato N-acetilglicosamina</i>
UFPR	<i>Universidade Federal do Paraná</i>
VLDL-c	<i>VLDL-Colesterol (Very Low Density Lipoprotein – Cholesterol)</i>
WHO	<i>World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)</i>
Wnt	<i>Wnt signaling pathways (Cascata de sinalização Wnt, termo que provém da combinação de Wg e INT, genes que codificam proteínas de integração)</i>

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) de diabéticos e controles	142
ANEXO 2	Formulário para coleta de dados dos participantes	145
ANEXO 3	Exemplo de detecção de polimorfismos por PCR em tempo real (rs7901695 do gene <i>TCF7L2</i>)	146
ANEXO 4	Análise do Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> para os polimorfismos em estudo	147
ANEXO 5	Sumários dos estudos de associação entre isoformas solúveis de RAGE e complicações vasculares em pacientes com DM2	148
ANEXO 6	Comprovante de submissão de artigo para a <i>Revista Panamericana de Salud Pública</i>	151
ANEXO 7	Comprovante de submissão para a Revista <i>Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>	152

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 <i>DIABETES MELLITUS</i>	19
3.2 CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	20
3.2.1 <i>Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)</i>	20
3.2.2 <i>Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)</i>	22
3.2.3 <i>Diabetes mellitus Gestacional (DMG)</i>	23
3.2.4 <i>Outros tipos específicos de DM</i>	24
3.3 DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	25
3.4 COMPLICAÇÕES VASCULARES DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	27
3.5 VIAS ENVOLVIDAS NAS COMPLICAÇÕES DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	28
3.6 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (<i>ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS - AGEs</i>)	30
3.7 RECEPTOR PARA OS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA – <i>RAGE</i>	32
3.7.1 <i>Isoformas solúveis de RAGE</i>	34
3.7.2 <i>Isoformas solúveis de RAGE e doenças</i>	37
3.8 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO <i>DIABETES MELLITUS</i>	38
3.9 GENE <i>FTO</i> (<i>FAT MASS AND OBESITY ASSOCIATED</i>).....	39
3.10 GENE <i>GCKR</i> (<i>GLUCOKINASE REGULATORY PROTEIN</i>)	42
3.11 GENE <i>LEPR</i> (<i>LEPTIN RECEPTOR</i>)	44
3.12 GENE <i>MMP9</i> (<i>MATRIX METALLOPEPTIDASE 9</i>)	46
3.13 GENE <i>PPARG</i> (<i>PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR</i>).....	48
3.14 GENE <i>RAGE</i> (<i>RECEPTOR FOR AGE</i>).....	51
3.15 GENE <i>TCF7L2</i> (<i>TRANSCRIPTION FACTOR 7- LIKE 2</i>)	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	56

4.1 AMOSTRA.....	56
4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	57
4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL	58
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS	60
4.5 ENZIMAIMUNOENSAIO (ELISA) PARA SRAGE E ESRAGE	62
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	63
4.7 FLUXOGRAMA DE TRABALHO	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	65
5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	72
5.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	83
5.3.1 Polimorfismo rs17576 do gene <i>MMP9</i>	85
5.3.2 Polimorfismo rs3134945 do gene <i>RAGE</i>	88
5.3.4 Polimorfismo rs780094 do gene <i>GCKR</i>	92
5.3.5 Polimorfismos rs1137100 e rs1137101 do gene <i>LEPR</i>	94
5.3.6 Polimorfismo rs1801282 do gene <i>PPARg</i>	98
5.3.7 Polimorfismo rs7901695 do gene <i>TCF7L2</i>	100
5.4 ISOFORMAS SOLÚVEIS DE RAGE NO DM2	102
5.5 ANÁLISE DE BIOMARCADORES GLICÊMICOS EM DOADORES DE SANGUE.....	106
5.5.1 “O banco de sangue na triagem do diabetes: uma alternativa válida?”... 106	
5.5.2 “Intervalo de referência para glicose ao acaso em doadores de sangue”	111
6 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é um problema de saúde pública que atinge mais de 350 milhões de pessoas no mundo. A projeção para o ano de 2030 é de 522 milhões de indivíduos afetados, caracterizando uma pandemia (WHITING *et al.*, 2011).

Mais de 80% dos pacientes com DM moram em países de baixa e média renda como o Brasil (GINTER; SIMKO, 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), 9,7% da população brasileira é diabética, e a expectativa para 2030 é que esta prevalência passe para 12,3%.

A morbidade e a mortalidade do DM são devidas principalmente às complicações vasculares. A condição diabética acelera a aterogênese, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC), assim como o desenvolvimento de complicações microvasculares, sendo as três principais: retinopatia, nefropatia e neuropatia (NAKA *et al.*, 2004; WAUTIER; SCHMIDT, 2004). Estas complicações micro e macrovasculares associadas ao DM reduzem substancialmente a qualidade de vida e são a principal causa de morte dos pacientes comprometidos (JEONG; KING, 2011).

Os DM tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) são síndromes poligênicas, e a importância do componente genético na patogênese do DM é suportada por diversos estudos (TODD, 1990; TUSIE LUNA, 2005; ALIZADEH; KOELEMAN, 2008; LAMBRINOUDAKI; VLACHOU; CREATSAS, 2010; BASILE *et al.*, 2014; BRUNETTI; CHIEFARI; FOTI, 2014). Múltiplos genes e polimorfismos de um único nucleotídeo, os SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, estão envolvidos com o DM (BASILE *et al.*, 2014; HUERTA-CHAGOYA *et al.*, 2015).

Os genes do sistema HLA (do inglês, *Human Leucocyte Antigen*, ou Antígeno Leucocitário Humano) conferem mais de 50% da susceptibilidade genética para DM1; no entanto, mais de 40 genes, classificados como genes HLA e não-HLA, já foram associados ao risco de desenvolver DM1 (SIMMONS; MICHELS, 2015).

Polimorfismos localizados em genes que atuam na sensibilidade à insulina hepática e periférica, na adipogênese e na função e massa das células beta-pancreáticas também têm sido associados ao risco para desenvolvimento de DM2 (BRUNETTI; CHIEFARI; FOTI, 2014).

O *diabetes mellitus* gestacional (DMG) apresenta características epidemiológicas e fisiopatológicas similares com o DM2, o que sugere que ambas as

condições compartilham uma base genética comum. De fato, polimorfismos associados ao risco para desenvolver DM2 tem sido associados à suscetibilidade para DMG (ROBITAILLE; GRANT, 2008; PAPPA *et al.*, 2011).

A hiperglicemia crônica característica do DM favorece a formação de produtos finais de glicação avançada, os AGEs (do inglês, *Advanced Glycation End Products*), que são aductos resultantes da ligação não-enzimática de um açúcar, como a glicose, e o grupamento amino de proteínas (THOMAS *et al.*, 2011). Os AGEs interagem com vários receptores celulares, incluindo o RAGE, do inglês *Receptor for Advanced Glycation End Products* (FLEMING *et al.*, 2011).

O receptor RAGE também é encontrado no plasma como isoformas solúveis, denominadas de sRAGE. Estas isoformas solúveis de RAGE têm sido apontadas como preditores de risco para complicações vasculares, assim como alvos terapêuticos para a prevenção destes eventos em indivíduos com DM. A dosagem plasmática das isoformas solúveis de RAGE pode ser utilizada para indicar risco aumentado para complicações associadas ao DM, ou proteção contra estas complicações (RAPOSEIRAS-ROUBIN *et al.*, 2010; ARABI *et al.*, 2011).

E ainda, polimorfismos no gene *RAGE*, os quais modificam sua expressão, e polimorfismos no gene *MMP9* (metaloprotease de matriz 9), que alteram a taxa de clivagem proteolítica da proteína RAGE, podem afetar os eventos desencadeados pela interação AGE-RAGE, interferindo na manifestação de complicações vasculares do DM (NAZIR *et al.*, 2014).

Embora o DM não tenha cura e sua fisiopatologia não seja completamente conhecida (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014), já é bem estabelecido que o diagnóstico precoce e a terapia adequada podem reduzir as complicações vasculares decorrentes da hiperglicemia crônica (DCCT, 1986; UKPDS, 1998). Conhecer o componente genético associado ao DM e suas complicações e conhecer biomarcadores de risco ou proteção para o desenvolvimento do DM é relevante para entender melhor o prognóstico e realizar um manejo precoce dos pacientes com DM, reduzindo, assim, a alta taxa de morbidade e mortalidade relacionada à patologia.

Com base nessas premissas, este trabalho tem como objetivo avaliar as concentrações de biomoléculas e a presença de variantes genéticas em uma população brasileira na busca de biomarcadores de risco ou proteção para o DM ou suas complicações vasculares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre biomarcadores e variantes genéticas no *Diabetes mellitus* tipo 1, 2 e gestacional e suas complicações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, biomarcadores inflamatórios e da função renal em amostras de pacientes com diabetes tipo 1, tipo 2 e gestacional, bem como em controles saudáveis estratificados para cada tipo de diabetes;
- Genotipar os polimorfismos rs17576 do gene *MMP9*, rs3134945 do gene *RAGE*, rs1421085 do gene *FTO*, rs780094 do gene *GCKR*, rs1137100 e rs1137101 do gene *LEPR*, rs1801282 do gene *PPAR γ* e rs7901695 do gene *TCF7L2*, através de PCR em tempo real em estudo do tipo caso-controle envolvendo pacientes com DM1, DM2 e DMG;
- Associar os polimorfismos em estudo com variáveis antropométricas, clínicas e laboratoriais;
- Quantificar as isoformas solúveis de RAGE (sRAGE e esRAGE) através de ensaio imunoenzimático (ELISA) em um subgrupo de pacientes com DM2 e controles saudáveis pareados por gênero e idade;
- Associar as isoformas solúveis de RAGE (sRAGE e esRAGE) com os parâmetros bioquímicos e antropométricos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) é definido como um grupo de desordens metabólicas, caracterizado por um estado de hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção da insulina, na sua ação ou ambas as situações. Os sintomas clássicos do DM são: poliúria, polidipsia e polifagia. Além das altas concentrações de glicose sanguínea, estão presentes anormalidades no metabolismo de proteínas e lipídeos (ADA, 2015).

Estima-se que 382 milhões de pessoas tenham DM no mundo e que dentro de vinte anos este número deva aumentar em 55%. O DM acomete mais homens do que mulheres, mas a expectativa é que esta diferença diminua (IDF, 2013). A Figura 1 ilustra a distribuição de DM entre os continentes.

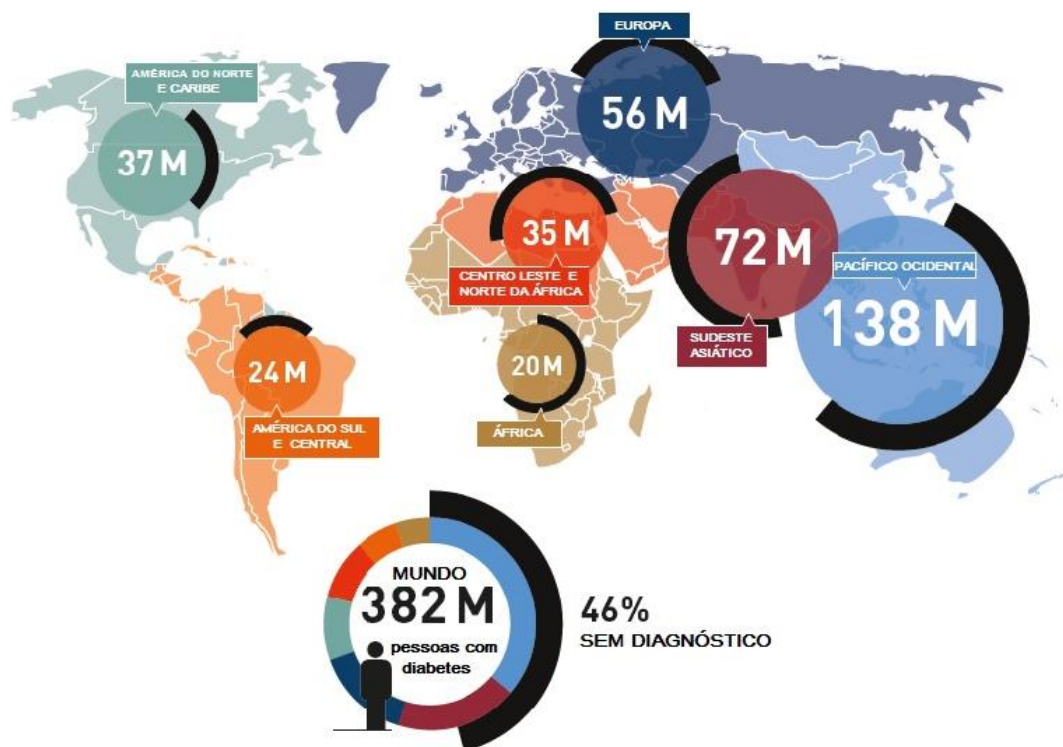


Figura 1 – Distribuição global do diabetes.

A prevalência de DM nos diferentes continentes apresenta marcada diferença, com destaque para os números nas ilhas do pacífico. Estima-se que 382 milhões de pessoas sejam diabéticas, sendo que aproximadamente 50% não têm diagnóstico.

Fonte: Adaptado de *International Diabetes Federation* - IDF (2013).

Identificar os novos casos de DM em países populosos como o Brasil requer estudos de seguimento de indivíduos durante anos, com determinações periódicas de glicemia, o que torna a tarefa difícil (SBD, 2015). Entretanto, em 2013 estimou-se que 12 milhões de brasileiros entre 20 e 79 anos teriam DM (IDF, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) calcula que 4–5% de todas as mortes ocorridas anualmente no mundo são decorrentes das complicações vasculares da doença, e que a mortalidade mundial por DM tende a crescer mais de 50% nos próximos 10 anos. Em 2012, 1,5 milhões de pessoas morreram devido às complicações do DM, fazendo com que esta patologia ficasse entre as quatro doenças não comunicáveis que mais matam no mundo (WHO, 2014).

3.2 CLASSIFICAÇÃO ETIOLÓGICA DO *DIABETES MELLITUS*

A classificação do DM preconizada pela Associação Americana de Diabetes (ADA), e amplamente utilizada pela comunidade científica, é baseada na etiologia das várias formas de DM (ADA, 2015), e as quatro categorias propostas são: *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1); *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2); outros tipos específicos de DM e *Diabetes mellitus* gestacional (DMG).

3.2.1 *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1)

O DM1 decorre da deficiência absoluta de insulina causada pela destruição, na maioria das vezes autoimune, das células beta pancreáticas. O DM1 é mais frequente em crianças e jovens, as quais podem apresentar cetoacidose como a primeira manifestação clínica da doença, o que é bastante grave (ADA, 2014).

O DM1 (5-10% dos casos de DM) pode ser do tipo imuno mediado, onde há a presença de um ou mais marcadores da destruição imune das células beta, como: anticorpos anti-ilhota pancreática, anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), anticorpos anti-tirosina fosfatase (IA-2 e IA-2b) e, anticorpos anti-transportador de zinco 8, ZnT8 (ADA, 2015). Ou pode ser do tipo idiopático, cuja etiologia não é conhecida. O DM1 imuno-mediado é também denominado tipo 1a; e o idiopático, tipo 1b. Apenas uma pequena porcentagem das pessoas com DM1 se enquadra na categoria 1b, sendo a maioria de origem africana ou asiática (REWERS, 2012).

As causas do DM1 não são totalmente conhecidas. A maioria das hipóteses aponta para um comprometimento na apresentação de antígenos às células T do timo e dos órgãos linfoides periféricos pelas moléculas do sistema HLA (BATTAGLIA, 2014). Todavia, existem fortes evidências que indicam fatores ambientais como gatilhos ou aceleradores da destruição da célula beta pancreática: a) menos de 10% dos indivíduos com susceptibilidade para o DM1 conferida pelo HLA progridem para manifestação clínica da doença; b) concordância de DM1 menor que 40% entre gêmeos monozigóticos; c) a incidência de DM1 em caucasianos que vivem na Europa é 10 vezes maior que em outras populações, sugerindo a presença de algum gatilho ambiental. Além disso, estudos de migração mostraram que a frequência de DM1 aumentou em uma população que se mudou de uma região de baixa incidência de DM1 para uma região de alta incidência, sugerindo que o ambiente favoreceu o aparecimento do DM1 (KNIP *et al.*, 2005).

A história natural do DM1 indica que a disfunção autoimune se desenvolve em etapas e, além da predisposição genética, existem eventos precipitantes desconhecidos envolvidos, conforme ilustrado na Figura 2.

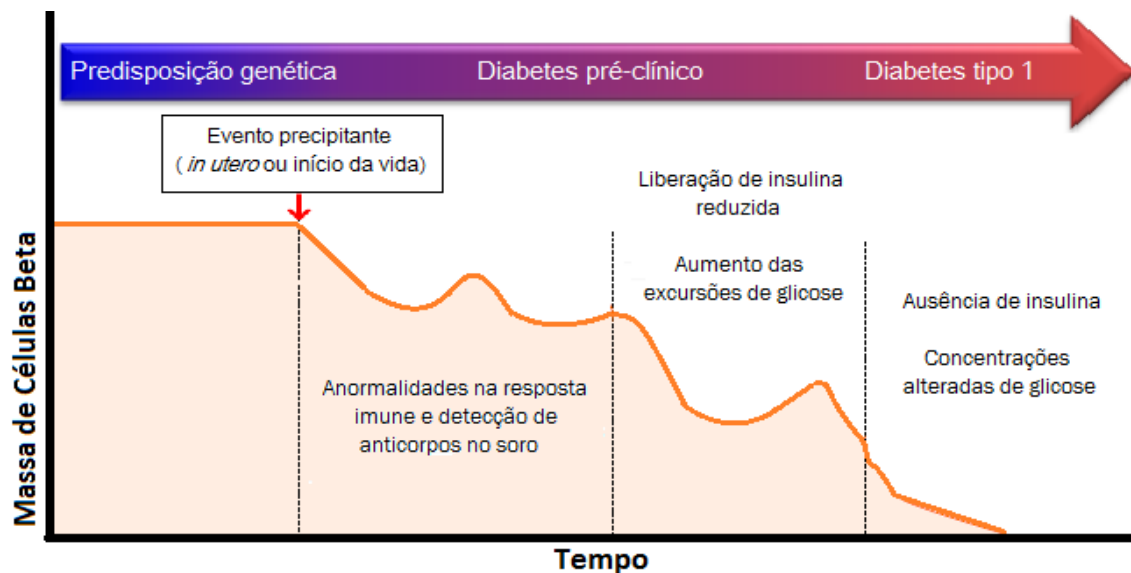


Figura 2 – História natural do DM1.

Um gatilho ambiental desencadeia anormalidades na resposta imune de indivíduos com predisposição genética aumentada para o DM1 (portadores de haplótipos DR4/DQ8 e/ou DR3/DQ2 dos genes HLA classe II) levando à perda de massa de células beta. Depois de iniciada a destruição autoimune das células beta, já é possível detectar anticorpos anti-ilhota pancreática no soro do paciente. Com a redução de forma recorrente e remissa da massa de células beta há uma redução na liberação de insulina com subsequente hiperglicemia.

Fonte: Adaptado de Eisenbarth e colaboradores (1986).

Entre os fatores ambientais que têm sido relacionados ao aparecimento do DM1, encontram-se a obesidade (ISLAM; SRINIVASAN; CRAIG, 2014), a ingestão de proteínas do leite de vaca (GOLDFARB, 2008), deficiência de vitamina D (GRIZ *et al.*, 2014), a microbiota intestinal (TAI; WONG; WEN, 2015) e micro-organismos como vírus e bactérias (SIMMONS; MICHELS, 2015).

3.2.2 *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2)

A maioria dos casos de DM (90–95%) se enquadram no tipo 2, que é caracterizado pela resistência à insulina e/ou deficiência na sua ação ou secreção. Múltiplas são as causas do DM2, mas sua patogênese ainda não é totalmente conhecida (ADA, 2015).

Pelo fato do DM2 ser uma condição crônica de início silencioso, com sintomas nem sempre perceptíveis, quase metade dos indivíduos com DM estão sem diagnóstico, o que significa que não têm conhecimento de sua condição e dos riscos associados a ela (SACKS *et al.*, 2011). O DM2 é mais comum em hipertensos, obesos, dislipidêmicos e mulheres que tiveram DMG (ADA, 2015).

A prevalência do DM2 tem aumentado em decorrência dos hábitos de vida sedentários, mudanças na dieta, envelhecimento populacional e obesidade (BHATTARAI, 2009). A obesidade é um dos principais fatores de risco para o DM2, e quanto maior o Índice de Massa Corpórea (IMC), maior o risco em desenvolver a doença. O tecido adiposo libera substâncias, como ácidos graxos livres e citocinas inflamatórias, envolvidas no desenvolvimento da resistência à insulina e, conseqüentemente, do DM2. (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006; SATTAR; GILL, 2014).

A Figura 3 ilustra a história natural do DM2 iniciada pela resistência à insulina não imuno-mediada, progredindo para uma disfunção das células beta pancreáticas e, conseqüentemente, intolerância à glicose, até o diabetes manifesto com gliconeogênese hepática.

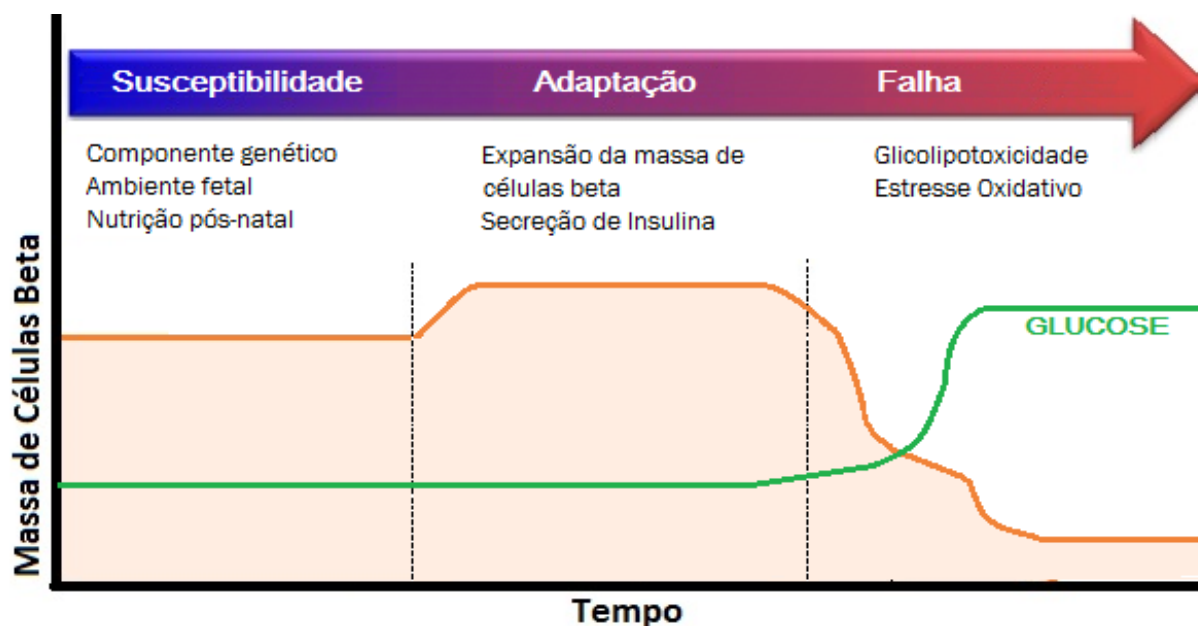


Figura 3 – História natural do DM2.

Indivíduos com risco aumentado para diabetes apresentam maior susceptibilidade pela presença de componentes genéticos, pelo ambiente fetal e ambiente nutricional nos primeiros anos de vida. Frente a diversos fatores de risco, como a obesidade, ocorre um aumento da massa e da função das células beta em resposta à resistência à insulina (fase de adaptação). Subsequentemente, as células beta falham neste processo de compensação levando ao diabetes (hiperglicemia crônica).

Fonte: Adaptado de Alejandro e colaboradores (2015).

3.2.3 *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG)

O *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) é definido como qualquer grau de intolerância à glicose, diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez (ADA, 2015). Em virtude da epidemia de obesidade, a prevalência de DM2 entre mulheres na idade fértil, que ficam sem diagnóstico, tem crescido. Por essa razão, a ADA (2015) recomenda que gestantes em acompanhamento pré-natal que tiveram diagnóstico de DM no primeiro trimestre sejam classificadas como tendo diabetes manifesto ou pré-gestacional.

O DMG acomete 1 a cada 25 gestações no mundo e está associado a complicações perinatais (IDF, 2013). Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas, em parte pela epidemia de obesidade, mas também pela idade materna avançada. No Brasil, cerca de 7% das gestações são complicadas pela hiperglicemia gestacional (SBD, 2015).

Assim como no DM2, a patogênese do DMG está associada tanto à resistência à insulina quanto à diminuição da função das células beta. A gestação é um estado hiperinsulinêmico caracterizado por uma diminuição da sensibilidade à

insulina. Esta condição é parcialmente explicada pela elevação na concentração de hormônios diabetogênicos (que bloqueiam ou antagonizam a ação da insulina) produzidos pela placenta, tais como a progesterona, o cortisol, a prolactina e o hormônio lactogênico placentário. No DMG, as células beta pancreáticas são incapazes de produzir insulina suficiente para compensar a resistência à insulina da gestação. O grau de resistência à insulina pode ser influenciado pela obesidade e pela história familiar (BUCHANAN; XIANG; PAGE, 2012; FLORES LE-ROUX; BENAIGES BOIX; PEDRO-BOTET, 2013).

Normalmente, o DMG desaparece após o parto. Entretanto, mulheres com DMG têm maior probabilidade de desenvolver DM2 e doenças cardiovasculares após a gravidez, em comparação com mulheres que permaneceram normoglicêmicas durante a gestação. Os fatores de risco para DMG incluem idade materna avançada, alta paridade, história familiar de DM, sobrepeso e obesidade (VALIZADEH *et al.*, 2015). O risco de gestantes com DMG desenvolverem novamente DMG nas gestações subsequentes, ou mesmo DM2 nos anos seguintes é de 10–60%. Por esta razão, mulheres com DMG devem ser rastreadas ao longo da vida para o desenvolvimento de DM ou intolerância à glicose (BUCHANAN; XIANG; PAGE, 2012). Além da gravidade para a mulher, as crianças nascidas de mães com DMG também têm risco aumentado para DM2 e obesidade na idade adulta (DURAN RODRIGUEZ-HERVADA; CALLE PASCUAL, 2015; MARTIN *et al.*, 2015).

3.2.4 Outros tipos específicos de DM

A maioria dos casos de DM se enquadram no tipo 1 e tipo 2. No entanto, a classificação do diabetes é complexa pelo caráter heterogêneo da doença, que pode apresentar etiologia e manifestações distintas (ADA, 2015).

Pesquisas realizadas nas últimas décadas possibilitaram a individualização das síndromes hiperglicêmicas, classificando outros tipos específicos de DM em oito grupos: a) defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas (diabetes tipo MODY, do inglês, *Maturity-Onset Diabetes of the Young*; ou diabetes da maturidade com início precoce); b) defeitos genéticos na ação da insulina; c) doenças do pâncreas; d) endocrinopatias; e) indução química ou por drogas; f) infecções; g)

formas incomuns de diabetes mediadas pelo sistema imune; e h) síndromes genéticas associadas ao diabetes (GROSS *et al.*, 2002; ADA, 2015; SBD, 2015).

O diabetes tipo MODY é uma forma monogênica de DM com transmissão autossômica dominante, apresentando defeitos na secreção de insulina. Em crianças e adolescentes cuja apresentação clínica de DM não se enquadra bem no tipo 1 ou no tipo 2, devem ser consideradas outras formas de diabetes, como as de causa monogênica (ANIK *et al.*, 2015).

3.3 DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS*

Os critérios diagnósticos preconizados pela ADA têm sido amplamente aceitos, e estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE DIABETES E CARACTERIZAÇÃO DE RISCO AUMENTADO PARA DM

Determinação laboratorial	Diabetes	Risco aumentado para DM
Hemoglobina glicada (HbA1c)* O teste deve ser realizado com metodologia certificada pela NGSP e padronizado conforme o método DCCT.	≥ 6,5%	Entre 5,7 e 6,4%
Ou		
Glicemia em jejum* Jejum é definido como a não ingesta calórica por pelo menos 8h.	≥ 126 mg/dL	Entre 100 e 125 mg/dL
Ou		
Glicemia 2h após TOTG * O teste deve ser realizado conforme orientações do WHO, usando sobrecarga de glicose com 75g de glicose anidra dissolvida em água.	≥ 200 mg/dL	Entre 140 e 199 mg/dL
Ou		
Glicemia ao acaso Em pacientes com os sintomas clássicos de hiperglicemia ou em crise hiperglicêmica.	≥ 200 mg/dL	-----
* Na ausência de hiperglicemia inequívoca, o resultado deve ser confirmado pela repetição do teste. NGSP: <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> ; DCCT: <i>The Diabetes Control and Complications Trial</i> ; TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose.		

Fonte: Adaptado de ADA (2015).

O diagnóstico do DMG segue critérios específicos e, atualmente, existem diferentes métodos sendo utilizados para este fim (AGARWAL; DHATT; OTHMAN, 2015). Não existe um consenso mundial, porque ainda não há evidências fortes que suportem a superioridade de uma estratégia sobre a outra (CUNDY, 2012; ADA, 2014; AGARWAL; DHATT; OTHMAN, 2015).

A Figura 4 esquematiza o critério atual para o diagnóstico do DMG, proposto pela Associação Internacional de Grupos de Estudo em Diabetes e Gravidez (*International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups*), IADPSG (METZGER, B. E. *et al.*, 2010), e aceito pela Sociedade Brasileira de Diabetes, SBD (2015) e ADA (2015).

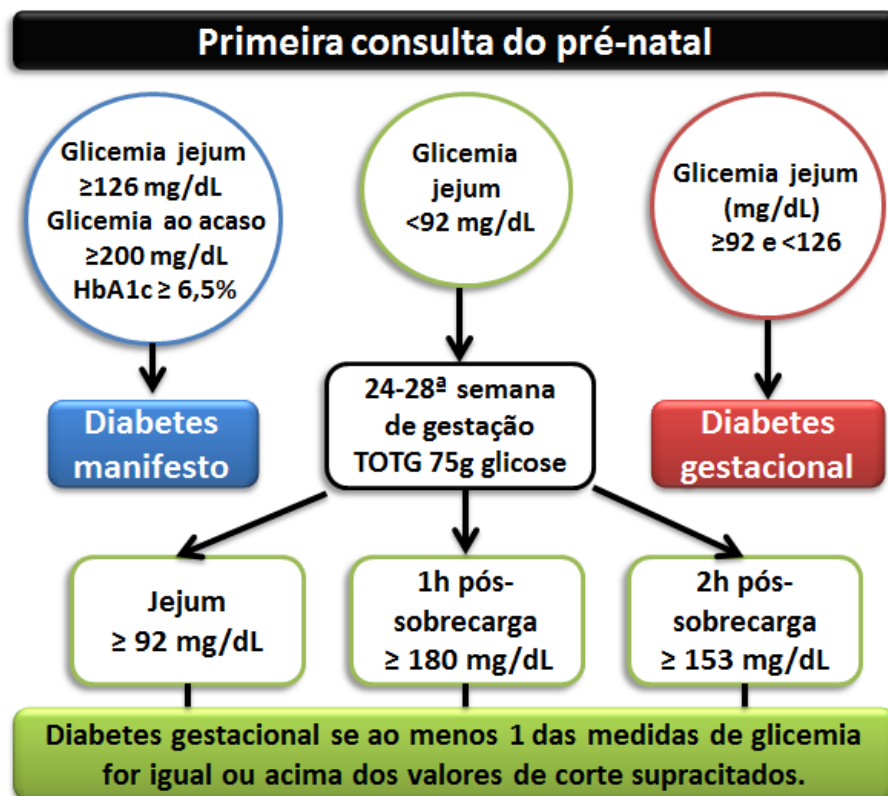


Figura 4 – Critérios para o diagnóstico de *Diabetes mellitus* gestacional.

Na primeira consulta pré-natal deve ser solicitada glicemia em jejum. Caso o valor encontrado seja ≥ 126 mg/dL, é feito o diagnóstico de DM pré-gestacional ou manifesto. Caso glicemia plasmática em jejum seja ≥ 92 mg/dL e < 126 mg/dL, é feito o diagnóstico de DMG. Em ambos os casos, deve ser confirmado o resultado com uma segunda dosagem da glicemia em jejum. Caso a glicemia seja < 92 mg/dL, a gestante deve ser reavaliada no segundo trimestre. A investigação de DMG deve ser feita em todas as gestantes sem diagnóstico prévio de diabetes. Entre a 24ª e 28ª semana de gestação deve-se realizar o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) com dieta sem restrição de carboidratos ou com, no mínimo, ingestão de 150g de carboidratos nos três dias anteriores ao teste, com jejum de oito horas.

Fonte: Adaptado de ADA (2015) e SBD (2015).

No presente estudo, as amostras de gestantes (saudáveis e com DMG) foram obtidas em anos anteriores, logo, o critério de diagnóstico empregado na época foi aquele preconizado pela ADA até o final do ano de 2010. Foram consideradas gestantes com DMG aquelas que apresentaram glicemia em jejum superior a 92mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glucose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas da ingestão da glucose (ADA, 2010).

3.4 COMPLICAÇÕES VASCULARES DO *DIABETES MELLITUS*

As complicações vasculares do DM podem ser divididas em microvasculares e macrovasculares. As complicações microvasculares são: a retinopatia, nefropatia e neuropatia; e macrovasculares, o IAM, o AVC e trombozes (SBD, 2015). Em geral, estas complicações são mais frequentes entre os pacientes com DM1, pois seu controle glicêmico é mais difícil que o de pacientes com DM2 (PEETERS *et al.*, 2015).

A retinopatia diabética é a complicação microvascular mais comum em pessoas com DM, e a principal causa de cegueira no mundo (HENRIQUES *et al.*, 2015). As causas da perda da visão envolvem a maculopatia diabética e as complicações da retinopatia diabética proliferativa, como a hemorragia vítrea, descolamento da retina e glaucoma (NENTWICH; ULBIG, 2015).

A nefropatia diabética ou doença renal do diabetes é uma síndrome caracterizada pela presença de albuminúria em quantidades superiores a 300 mg/dia e declínio da função renal em pacientes com DM sem infecções do trato urinário ou outras doenças renais, e é a principal causa de doença renal crônica em países ocidentais (LIM, 2014).

Outra complicação microvascular do DM é a neuropatia, que pode se manifestar de várias formas dependendo de qual fibra nervosa foi comprometida. A neuropatia mais conhecida é a periférica ou polineuropatia distal simétrica, que afeta mais de 50% dos pacientes com DM e é caracterizada por redução da sensibilidade superficial e dor neuropática severa. A redução da sensibilidade aumenta o risco de lesões nas regiões distais afetadas (mãos e, principalmente, pés), que podem infectar e evoluir para necrose tecidual e necessidade de amputação (DIXIT; MAIYA,

2014). O risco de ulceração e amputação entre pacientes com DM aumenta de 2 a 4 vezes com a idade e o tempo de duração do DM, independentemente do tipo de DM (AL-RUBEAN *et al.*, 2015).

A aterosclerose, doença inflamatória crônica de origem multifatorial, está envolvida no comprometimento de grandes vasos e, conseqüentemente, no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. As manifestações clínicas da aterosclerose nos pacientes com DM ocorrem principalmente nas artérias coronárias, cerebrais, periféricas, carótidas e aorta (BROWNLEE, 2005; TOUSOULIS; KAMPOLI; STEFANADIS, 2012). O IAM, o AVC e a doença vascular periférica são mais frequentes em pacientes com DM que em indivíduos não diabéticos (TRICHES *et al.*, 2009). As razões para a manifestação de aterosclerose acelerada em pacientes com DM ainda não são completamente compreendidas. Os efeitos tóxicos diretos da glicose sobre o epitélio vascular, a resistência à insulina e a associação do DM a outros fatores de risco, como a obesidade e dislipidemias são os mecanismos prováveis (TOUSOULIS; KAMPOLI; STEFANADIS, 2012). Processos pró-inflamatórios e pró-coagulantes, como o aumento na agregação plaquetária e disfunção na fibrinólise, além das alterações no metabolismo dos lipídios e dislipidemias, também contribuem para o risco aumentado para doenças cardiovasculares em indivíduos com DM (NANDISH; OLIVEROS; CHILTON, 2011).

3.5 VIAS ENVOLVIDAS NAS COMPLICAÇÕES DO *DIABETES MELLITUS*

Diversos estudos mostram que várias vias do metabolismo da glicose estão implicadas no desenvolvimento da disfunção endotelial e, conseqüentemente, das complicações vasculares. A disfunção ocorre não apenas pelo aumento de metabólitos que agredem o endotélio, mas também pela redução de fatores protetores endógenos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), enzimas antioxidantes, entre outros (JEONG; KING, 2011).

Dentre os mecanismos envolvidos nas complicações do DM, podem ser citados: a) aumento da atividade da via dos polióis; b) aumento do influxo da via da hexosamina; c) ativação da proteína quinase C; d) produção de superóxido pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e d) glicação não enzimática de proteínas produzindo produtos finais de glicação avançada (AGE), os quais ativam

sinalizações através do receptor RAGE (BROWNLEE, 2001; YONEKURA et al., 2005).

a) Aumento da ativação da via dos polióis:

A enzima aldose redutase catalisa a redução de glicose em excesso a sorbitol (álcool da glicose), em várias células que não utilizam insulina, como as do cérebro, retina, nervos periféricos e rim. Posteriormente, o sorbitol é oxidado à frutose pela sorbitol desidrogenase. O acúmulo de sorbitol intracelular promove desequilíbrio osmótico e diminuição de fosfato de dinucleotídeo nicotinamida-adenina (NADPH) no citosol. A redução de NADPH disponível leva a uma maior formação de metilglioxal e AGEs que exercem efeitos lesivos ao endotélio (YAMAGISHI *et al.*, 2012); fatores associados às complicações microvasculares (AHSAN, 2015).

b) Aumento do influxo da via da hexosamina

A UDP-N-acetilglicosamina formada quando há excesso de glicose intracelular regula, indiretamente, a expressão de proteínas como o fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta, do inglês *Transforming Growth Factor beta*) e o inibidor do ativador do plasminogênio I (PAI-I; *Plasminogen Activator Inhibitor-1*), envolvidas na disfunção vascular do diabetes. Além disso, a via da hexosamina está associada com o aumento do estresse oxidativo (MARCOVECCHIO; LUCANTONI; CHIARELLI, 2011).

c) Ativação persistente da proteína quinase C (PKC):

A hiperglicemia aumenta a concentração de diacilglicerol (DAG) que, por sua vez, ativa a PKC, desencadeando: a) aumento da permeabilidade vascular pelo aumento na expressão de VEGF nas células musculares lisas, b) comprometimento do fluxo sanguíneo decorrente da redução da atividade endotelial da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e/ou decorrente do aumento da síntese de endotelina-1, c) espessamento da membrana basal do endotélio pelo aumento da produção de colágeno e fibronectina induzida pelo TGF-beta, além de adesão leucocitária e angiogênese (JEONG; KING, 2011; DURPES *et al.*, 2015).

d) Aumento do estresse oxidativo pela produção de superóxido (O_2^-):

As principais espécies reativas (espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio) podem atacar biomoléculas. Mesmo os radicais livres superóxido e óxido nítrico, relativamente pouco agressivos, são capazes de iniciar ou mediar reações fisiológicas e patológicas, como as complicações vasculares do DM (SON, 2012).

O estresse oxidativo é definido como uma superprodução de espécies reativas de oxigênio e/ou decréscimo dos mecanismos de defesa antioxidante, e parece estar envolvido em todas as vias ativadas pela hiperglicemia anteriormente citadas, já que a superprodução de O_2^- na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é comum a todas elas (BROWNLEE, 2005). O quadro oxidativo leva à resistência à insulina, intolerância à glicose, disfunção das células beta e disfunção mitocondrial, as quais favorecem também as complicações vasculares do diabetes (RAINS; JAIN, 2011).

e) Glicação não enzimática de proteínas e formação de AGEs:

Os AGEs, formados após longos períodos de hiperglicemia crônica, ativam sinalizações através da ligação com diversos receptores, sendo o RAGE o mais bem caracterizado. A ligação AGE-RAGE promove estresse oxidativo e estímulo da liberação de citocinas e fatores de crescimento por diversas células como macrófagos, células mesangiais renais e do endotélio vascular. Esses componentes desencadeiam processos inflamatórios e disfunção endotelial, base da fisiopatologia do DM (BROWNLEE, 2001; YONEKURA *et al.*, 2005; TESSIER, 2010).

3.6 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (*ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS* - AGEs)

Os AGEs são produtos resultantes de reações de glicação não enzimática e de glicoxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, sendo a reação de *Maillard* a mais conhecida. A Figura 5 ilustra as etapas da reação de *Maillard* com formação de três diferentes AGEs.

Os AGEs também podem ser formados por uma via alternativa através dos compostos glicolíticos intermediários como os alfa-dicarbonílicos altamente reativos (glioxal, metilglioxal, e 3-deoxiglucosone), formados por diversos mecanismos como

a degradação dos produtos de Amadori, estresse oxidativo e decomposição de intermediários fosforilados (BOS; DE RANITZ-GREVEN; DE VALK, 2011). Estes compostos são considerados os principais intermediários na formação dos AGEs já que são mais reativos que a glicose em normoglicemia. A alta concentração de glicose, comum em pacientes com DM mal controlados, passou a ser considerada o evento primário para formação acelerada de AGEs (BROWNLEE, 2005).

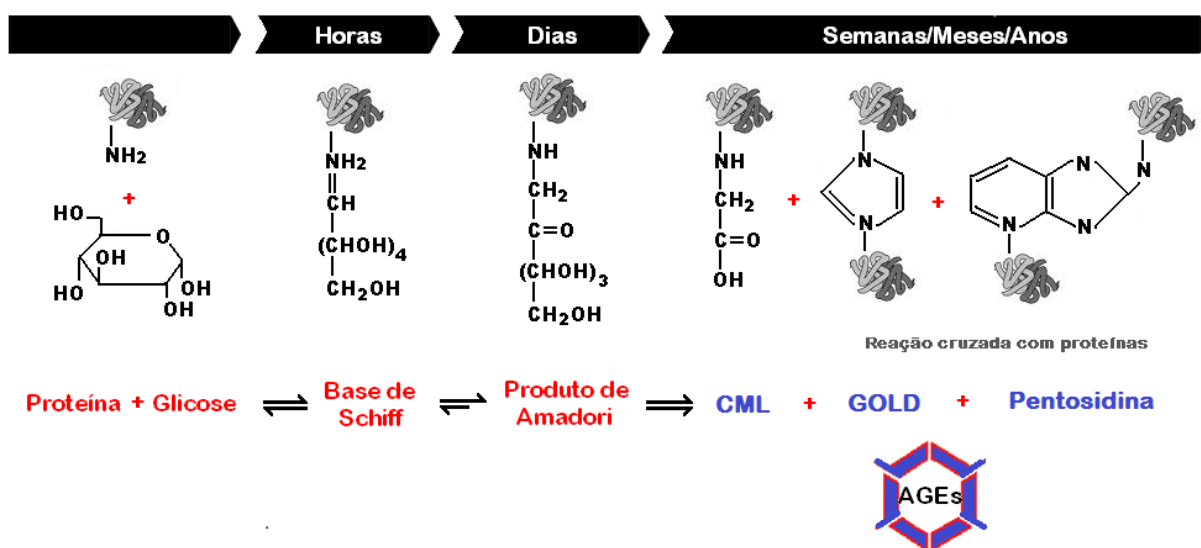


Figura 5 – Etapas da reação de Maillard.

A glicose reage, de forma não enzimática, com proteínas extracelulares, numa reação também conhecida como glicação. Esta reação tem início com a formação reversível de uma base de Schiff entre o carboidrato e o grupamento amino da proteína, que evolui para formar um intermediário estável (cetoamina), designada produto de Amadori. Após uma complexa e repetida cascata de reações de desidratação, condensação, oxidação e ciclização, que podem demandar meses, formam-se produtos estáveis de glicação avançados, os AGEs (CML, carboximetil-lisina. GOLD, dímero de glicoxal-lisina).

Fonte: Autor (ANGHEBEM-OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os AGEs são derivados da ligação de um carboidrato com resíduos de lisina ou de arginina das proteínas, sendo que alguns podem formar ligações cruzadas (*crosslinks*) entre proteínas. É possível que outros produtos similares sejam formados durante a reação de glicação tendo como alvos grupos nucleofílicos das proteínas, como as cadeias laterais de histidina, serina e treonina, triptofano e tirosina (THORPE; BAYNES, 2003).

São AGEs derivados de lisina: Ne-carboxietil-lisina (CEL), pirralina, dímero de lisina e derivado do glicoxal (GOLD), dímero de lisina e derivado do metil glicoxal (MOLD), dímero de lisina e derivado da 3-deoxiglucosona (DOLD). A Ne-

carboximetil-lisina (CML) é o AGE melhor caracterizado e aquele que apresenta a maior concentração sérica em humanos, sendo derivado do glicoxal. Entre os AGEs descritos derivados de arginina estão: glicoxal hidroimidazolona (G-H1), metilglicoxal hidroimidazolona (MG-H1) e 3-deoxiglucosona hidroimidazolona (3DG-H1). Outros AGEs como o AFGP (1-alquil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol) e FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-imidazol) e pentosidina são fluorescentes (DETTORAKI; GIL; SPILIOTIS, 2009; MIYAZAWA *et al.*, 2012).

Os AGEs induzem várias respostas celulares, não somente no processo de captação endocítica e degradação, mas também na indução de citocinas, fatores de crescimento e estresse oxidativo, os quais estão atrelados ao desenvolvimento das complicações vasculares diabéticas (MIYAZAWA *et al.*, 2012).

Mecanismos dependentes de receptor provavelmente estão envolvidos na disfunção tecidual induzida por AGEs, estimulando vários fenômenos biológicos em monócitos/macrófagos, células endoteliais e células mesangiais (IACOBINI *et al.*, 2009). Diversos receptores celulares, que apresentam capacidade de ligação com os AGEs, foram identificados em diferentes tipos de células, incluindo o RAGE, os receptores AGE (AGE-R: AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3), a galectina-3 (similar ao AGE-R3), o SRA (Receptores *scavenger* de macrófagos classe A tipos I e II), CD-36 ou glicoproteína III-b, e LOX-1 ou receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada similar a lectina, do inglês *Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor 1* (OTT *et al.*, 2014).

O receptor para AGE melhor caracterizado é o RAGE. Existem evidências de que a interação AGE-RAGE induza inflamação e estresse oxidativo, o qual propicia a formação e acúmulo de mais AGE e, conseqüentemente, superexpressão de RAGE em pacientes com DM. Essa retroalimentação cria um ciclo vicioso que pode explicar o fenômeno chamado de “memória metabólica” nas complicações vasculares do DM, onde, mesmo após um período de controle glicêmico, as complicações vasculares não regridem (JAX, 2010).

3.7 RECEPTOR PARA OS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA – RAGE

O receptor RAGE originalmente isolado do endotélio pulmonar bovino é um membro da superfamília das imunoglobulinas da superfície celular caracterizando-se

como multiligante, sendo capaz de interagir também, além do AGE, com as proteínas de alta mobilidade Box-1 (*High Mobility Group* ou HMG-box 1), fibrilas beta-amilóides, S100/calgranulinas, com a anfoterina, transtiretina e uma integrina leucocitária, Mac-1 ou *Macrophage antigen-1* (NEEPER *et al.*, 1992; SCHMIDT *et al.*, 1992; KALEA; SCHMIDT; HUDSON, 2009; LINDSEY *et al.*, 2009; VAN ZOELLEN *et al.*, 2009).

Embora concentrações basais elevadas de RAGE sejam encontradas no pulmão, particularmente em células epiteliais alveolares tipo I (DEMLING *et al.*, 2006), vários tecidos o expressam em concentrações moderadamente baixas, incluindo fígado, cérebro, coração e tecido esquelético (BRETT *et al.*, 1993). O RAGE também é expresso em células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos-macrófagos, linfócitos, células apresentadoras de antígenos, células T regulatórias (ROJAS; FIGUEROA; MORALES, 2010) e eosinófilos (CURRAN; BERTICS, 2011).

RAGE é uma proteína transmembrana do tipo 1 de aproximadamente 45-55 kDa, consistindo de 404 aminoácidos (NEEPER *et al.*, 1992). A proteína RAGE possui três domínios, sendo um de ligação aos ligantes extracelulares (aminoácidos 1 ao 339), um domínio transmembrana hidrofóbico (aminoácidos 340 ao 361) e um domínio hidrofóbico citoplasmático intracelular altamente carregado – aminoácidos 362 ao 404 (KALEA; SCHMIDT; HUDSON, 2009). A porção citoplasmática de RAGE é o domínio crítico para a sinalização intracelular induzida pelo ligante. Deleções deste domínio promovem um receptor RAGE inativo, ou seja, bloqueia a indução de sinal intracelular e, conseqüentemente, a efetividade do receptor. O domínio extracelular é constituído de um peptídeo sinal N-terminal (aminoácidos 1 ao 22), de um domínio de imunoglobulina do tipo V (variável, aminoácidos 23 ao 116), e de dois domínios de imunoglobulina do tipo C (constante) estabilizados por pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína (aminoácidos 124 ao 221 no domínio C1 e aminoácidos 227 ao 317 no domínio C2). O domínio V contempla dois supostos sítios de ligação para produtos de glicação, sendo o domínio principal de interação com ligantes (KISLINGER *et al.*, 1999); contudo, a interação dos domínios tipo C a ligantes também está descrita (RAMASAMY; YAN; SCHMIDT, 2012).

A interação do ligante ao RAGE induz diversos tipos de cascatas de sinalização, dependendo do tipo celular e estado fisiopatológico. As cascatas de sinalização incluem numerosos membros das famílias MAPK (proteína quinase

ativada por mitógenos - *Mitogen-Activated Protein Kinase*), JAK/STAT [janus quinase-transdutores de sinal e ativadores de transcrição - *Janus Kinase (JAK)* – *Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)*], Rho GTPases (Família Rho de GTPases) e vários fatores transcrpcionais como NF-kB (fator nuclear kappa B - *Nuclear Factor kappa B*) e Egr-1, proteína 1 de resposta rápida de crescimento - *Early growth response protein 1* (ZENG *et al.*, 2009). Estas vias de sinalização associadas induzem o receptor RAGE à ativação de vários genes pró-inflamatórios e mudanças fenotípicas celulares incluindo o estímulo a migração, invasão, proliferação e apoptose (HARJA *et al.*, 2008). Além do RAGE expresso nas membranas das células, várias isoformas têm sido descritas, e existem 19 variantes de *splicing* de ocorrência natural que foram identificadas em nível de RNAm e proteína (STERENCZAK; NOLTE; MURUA ESCOBAR, 2013).

Estas isoformas são caracterizadas por formas truncadas da região N-terminal ou C-terminal, incluindo sRAGE1, sRAGE2, sRAGE3 (SCHLUETER *et al.*, 2003; YONEKURA *et al.*, 2003), hRAGEsec (MALHERBE *et al.*, 1999), N truncada (YONEKURA *et al.*, 2003), RAGE_v4 – RAGE_v13 (HUDSON *et al.*, 2008b), RAGE Δ , NtRAGE Δ , sRAGE Δ (DING; KELLER, 2005, 2005), e Δ 8-RAGE (PARK, I. H. *et al.*, 2004).

Posteriormente, Hudson e colaboradores (2008b) resumiram todas estas isoformas de RAGE humano e as renomearam em RAGE_v1 à RAGE_v19 de acordo com a nomenclatura de genes humanos (CHUAH *et al.*, 2013). A figura 6 ilustra a estrutura do RAGE completo e de algumas de suas isoformas.

3.7.1 Isoformas solúveis de RAGE

É comum entre os receptores de membrana, a formação de isoformas variantes secretadas ou solúveis, que podem atuar como reguladores, agonistas ou antagonistas da forma funcional ligada à membrana celular (SCHLUETER *et al.*, 2003).

Malherbe e colaboradores (1999) foram os primeiros a descrever uma variante solúvel do RAGE, designada hRAGEsec. Com o tempo, outras variantes solúveis (sRAGE) foram descritas, como o esRAGE (*endogenous secretory RAGE*), em humanos e camundongos (MALHERBE *et al.*, 1999; YONEKURA *et al.*, 2003; HUDSON *et al.*, 2008b; KALEA; SCHMIDT; HUDSON, 2009).

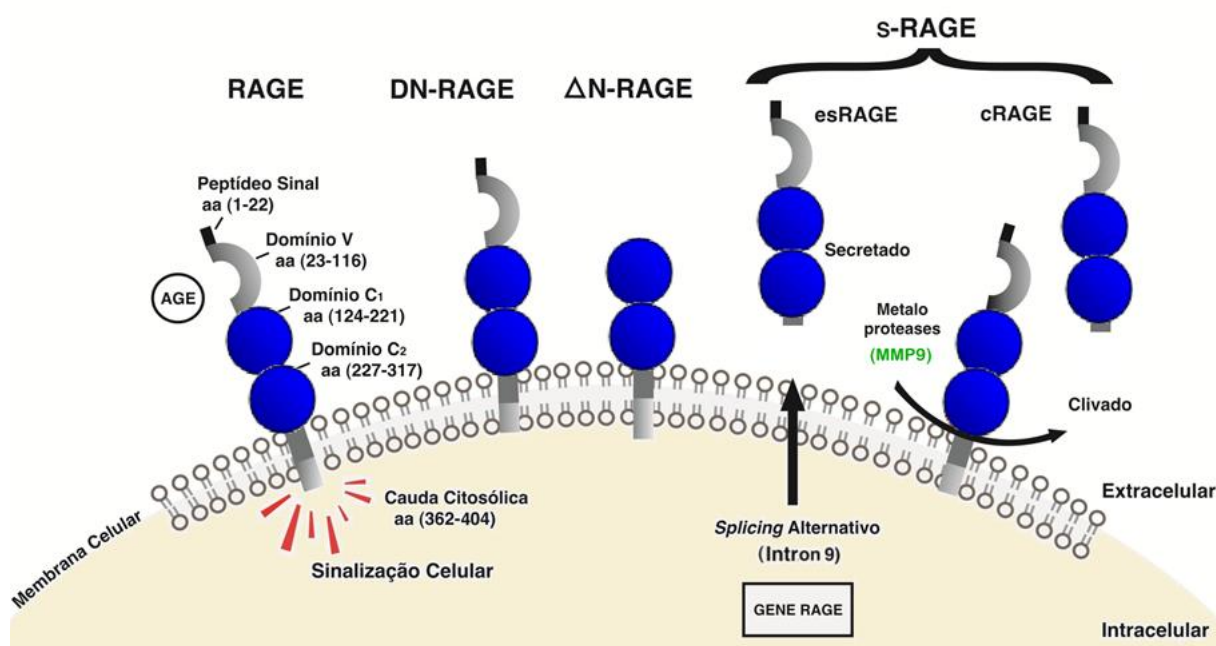


Figura 6 – Receptor RAGE e suas isoformas.

O RAGE, receptor para produtos finais de glicação avançada, é um receptor transmembrana que interage com vários ligantes como AGE, HMGB1 e S100, promovendo sinalização celular. Algumas isoformas como o DN-RAGE (RAGE dominante negativo), interagem com ligantes, mas não promovem transdução de sinal pela ausência da cauda citosólica. Já o Δ N-RAGE é uma isoforma do receptor sem o domínio V, o que impossibilita a interação com ligantes. As isoformas solúveis de RAGE (sRAGE) interagem com ligantes na circulação, com isso a transdução de sinal celular não ocorre. Existem duas isoformas solúveis de RAGE, o esRAGE (RAGE endógeno secretório), que é gerado por *splicing* alternativo no intron 9 do gene RAGE, e o cRAGE (RAGE clivado), gerado através de clivagem proteolítica por metaloproteases.

Fonte: Autor (ANGHEBEM-OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os dois mecanismos primários que geram sRAGE são o *splicing* alternativo de RNA e a clivagem proteolítica do RAGE completo. O *splicing* alternativo no intron 9 resulta no esRAGE, uma forma C-truncada de RAGE; enquanto que a clivagem proteolítica do RAGE de membrana completo origina o cRAGE (YONEKURA *et al.*, 2003; HANFORD *et al.*, 2004). As formas solúveis do receptor RAGE encontradas na circulação podem atuar como removedores de ligantes de RAGE e bloqueadores de RAGE, sendo que o uso de sRAGE recombinante melhora as complicações vasculares em modelos animais (PARK, L. *et al.*, 1998; GOOVA *et al.*, 2001; BUCCIARELLI *et al.*, 2002). Assim, a modulação de sRAGE constituiria uma forma de proteger os tecidos contra os efeitos tóxicos dos AGEs (GEROLDI; FALCONE; EMANUELE, 2006). Além de constituir um potencial alvo terapêutico, evidências clínicas recentes têm sugerido que a dosagem de sRAGE plasmático poderia ser

utilizada como um biomarcador de patologias mediadas por RAGE (MAILLARD-LEFEBVRE *et al.*, 2009).

As isoformas solúveis de RAGE possuem as mesmas regiões V e C encontradas no RAGE, porém não possuem a hélice transmembrana e a cauda citosólica (HANFORD *et al.*, 2004; HUDSON *et al.*, 2008b).

Isoforma solúvel de RAGE gerada por *splicing*

A isoforma solúvel sRAGE_v1, previamente denominada de esRAGE, é produzida devido ao *splicing* alternativo do intron 9 com remoção do exon 10, que modifica a fase de leitura do transcrito resultando em um códon de parada prematura no intron 9 que, no produto de tradução, corresponderia à hélice transmembrana e à cauda citosólica do RAGE completo. Como resultado haverá a introdução de 16 novos aminoácidos na região C-terminal, e geração da isoforma solúvel. Essa sequência de aminoácidos diferencia o RAGE de membrana daquele gerado por *splicing*, e isso permitiu a produção de anticorpos comerciais específicos para esRAGE, os quais não detectam o RAGE de membrana. Experimentos utilizando a técnica de *Western Blot* demonstram que o esRAGE é secretado e migra como uma proteína de aproximadamente 48 kDa, comparado a 55 kDa do receptor inteiro. A terminologia atual para a isoforma esRAGE é RAGE_v1, mas o termo esRAGE tem sido mantido, provavelmente por ser assim que o teste é descrito pelos fabricantes (HUDSON *et al.*, 2008b).

Estudos mostram que o *splicing* alternativo em humanos depende do tipo celular ou tecido. Por exemplo, em pulmão humano e células da musculatura lisa da aorta, o RNAm do RAGE completo é a forma mais prevalente, mas nas células endoteliais o RNAm de esRAGE é a forma prevalente (CHENG, C. *et al.*, 2005; HUDSON *et al.*, 2008b).

Isoforma solúvel de RAGE gerada por proteólise

As proteínas da superfamília ADAM (do inglês, *A Disintegrin And Metalloprotease Domain*), que recebem esta denominação por possuírem desintegrina e metaloprotease como domínios estruturais, desempenham função reguladora na superfície celular. As ADAMs podem influenciar interações célula-célula e célula-matriz pela clivagem e remodelamento de proteínas da membrana

extracelular e, possivelmente, pela interação com moléculas de adesão da matriz (WHITE, 2003).

As alfa-secretases ADAM-10 e a metaloproteases MMP9 têm sido apontadas como responsáveis pela clivagem proteolítica do RAGE com liberação do ectodomínio. O domínio transmembrana remanescente é, então, clivado por gama-secretases, sendo liberado para o citoplasma (RAUCCI *et al.*, 2008; METZ *et al.*, 2012).

A proteólise de RAGE ocorre constitutivamente e é estimulada pela ativação da proteína quinase C (PKC) cálcio-dependente (ZHANG *et al.*, 2008). O cRAGE é a isoforma predominante no soro; assim, o aumento da clivagem proteolítica resultará no aumento da concentração de sRAGE (RAUCCI *et al.*, 2008).

3.7.2 Isoformas solúveis de RAGE e doenças

A associação da concentração de sRAGE total com estados patológicos têm sido amplamente investigada, com resultados controversos. Esta associação foi primeiramente descrita por Falcone e colaboradores (2005), onde concentrações plasmáticas reduzidas de sRAGE total estavam associadas com maior risco de doença arterial coronariana, DAC. Posteriormente, a concentração plasmática de sRAGE foi associada à diversas condições patológicas, tais como DM1 e doenças cardiovasculares (THOMAS *et al.*, 2011), tumores (JIAO *et al.*, 2011; JIAO *et al.*, 2011), doença pulmonar aguda (CREAGH-BROWN *et al.*, 2010) e doença renal (NISHIZAWA; KOYAMA, 2008). Ainda, outros estudos sugerem que as concentrações de sRAGE podem estar elevadas em resposta aos AGEs circulantes, tornando-se assim um bom marcador de injúria vascular em pacientes com DM2 (NAKAMURA *et al.*, 2008a). Em experimentos realizados por Raposeiras-Roubín e colaboradores (2010) a concentração de sRAGE foi correlacionada positivamente com a isquemia em pacientes com insuficiência cardíaca, com a severidade da doença e como marcador independente para a DAC (RAPOSEIRAS-ROUBIN *et al.*, 2010). Ainda, o aumento da concentração de sRAGE total tem sido associado com extrema longevidade, sugerindo o envolvimento de RAGE/sRAGE no processo de envelhecimento (GEROLDI; FALCONE; EMANUELE, 2006). Em contrapartida, foi relatado que um aumento nos sRAGE em crianças com DM1 pode proteger temporariamente as células contra as injúrias causadas pelos AGEs e parece ser

suficiente para eliminar o excesso de carboximetil-lisina circulante (DETTORAKI; GIL; SPILLOTIS, 2009).

Estudos que focam especificamente a dosagem de esRAGE associam baixas concentrações plasmáticas de esRAGE com aterosclerose de íntima e carótida em paciente com ou sem DM (KATAKAMI *et al.*, 2008; CHOI, K. M. *et al.*, 2009), síndrome metabólica (KOYAMA *et al.*, 2005), anemia (SEMBA *et al.*, 2009) e autismo (BOSO *et al.*, 2006).

A regulação e a função do esRAGE na aterosclerose em pacientes com DM pode diferir. Sua concentração aumentada está positivamente associada com a presença de DAC em pacientes com DM2, e com biomarcadores de inflamação, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e molécula solúvel de adesão celular vascular-1 (sVCAM-1) nestes pacientes (NAKAMURA *et al.*, 2007a; NAKAMURA *et al.*, 2007b). Outro estudo, porém, relatou a associação inversa entre as concentrações de esRAGE e alterações renais em crianças com DM1, sugerindo a importância dessa isoforma em estágios precoces da nefropatia diabética (GIANNINI *et al.*, 2012). Como AGEs regulam positivamente a expressão de RAGE em vários tecidos e o sRAGE pode ser gerado pela clivagem do RAGE de superfície celular por ação de metaloproteases de matriz, as concentrações de sRAGE podem estar positivamente associadas com AGEs circulante, podendo refletir a expressão tecidual de RAGE. Estas contradições poderiam ser assim explicadas, mas esse mecanismo ainda é desconhecido (NAKAMURA *et al.*, 2008b).

3.8 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES MELLITUS

O DM é uma patologia complexa com interação de fatores genéticos e ambientais que determinam a disfunção das células beta pancreáticas e a resistência à insulina. O entendimento sobre os genes envolvidos no desenvolvimento do DM é maior em relação ao DM1, com a forte associação das variações na região HLA; diferente do DM2, onde há uma relação multifatorial e poligênica (GROOP; POCIOT, 2014).

As causas genéticas da resistência insulínica e do DM2 ainda não são totalmente conhecidas e são alvos de estudos de associação de genes candidatos e estudos de associação ampla de genomas, ou GWAS, *Genome-Wide Association*

Studies (PETRY, 2010). Estes estudos permitiram a detecção de marcadores genéticos de risco nos genes ou próximo a eles (RACITI *et al.*, 2015). Ao menos 65 variantes comuns já foram fortemente associadas ao risco para DM2; no entanto, ainda existem lacunas no entendimento da genética do DM (MORRIS *et al.*, 2012).

O DMG e o DM2 apresentam características fisiopatológicas semelhantes (PAPPA *et al.*, 2011), sugerindo que o DMG também seja uma patologia poligênica. Portanto, os estudos a respeito da etiologia do DMG ainda baseiam-se nas variantes dos genes que predisõem ao DM2 (ROBITAILLE; GRANT, 2008).

3.9 GENE *FTO* (FAT MASS AND OBESITY ASSOCIATED)

O gene *FTO* ou gene associado à massa corporal e à obesidade foi identificado primeiramente em camundongos que apresentavam os dedos unidos, recebeu o nome de *FT* (do inglês, *Fused Toes*). Por ser um gene grande foi apelidado de *FATSO* (gorducho) e abreviado *FTO* (PETERS; AUSMEIER; RUTHER, 1999).

O *FTO* codifica uma demetilase de ácidos nucléicos dependente de 2-oxoglutarato que remove grupamentos metil do DNA e do RNA. A enzima *FTO* pertence à superfamília dioxigenases dependentes de Fe (II) e de 2-oxoglutarato (2OG), homóloga à família de proteínas AlkB (*Alkylation*), as quais são enzimas de reparo do DNA por dano por alquilação (GERKEN *et al.*, 2007; SANCHEZ-PULIDO; ANDRADE-NAVARRO, 2007; GULATI; YEO, 2013).

A proteína *FTO* compreende dois domínios: um domínio N-terminal contendo um núcleo catalítico, e um domínio C-terminal com um papel desconhecido. O domínio N-terminal possui um resíduo de 5 aminoácidos, presente em todos os membros da sua superfamília, que é necessário para a ligação do Fe (II) e do 2OG. Diferente das outras proteínas AlkB, a proteína *FTO* possui uma região adicional, denominada *Loop 1* ou *Alça 1*. Através do impedimento estérico, esta região fornece especificidade para os ácidos nucleicos de cadeia simples durante a ligação do substrato (HAN *et al.*, 2010).

A enzima *FTO* está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma celular e existe uma fração dela que caminha entre os dois compartimentos (GULATI *et al.*, 2014). O papel funcional mais importante da enzima *FTO* é a demetilação N⁶

metiladenosina (m^6A), regulando o processamento, a estabilização e o *splicing* alternativo de RNAm. O RNAm é transcrito e processado no núcleo, antes de ser transportado para o retículo endoplasmático para ser traduzido. Ainda não está claro em que etapa a FTO faria a demetilação do m^6A (GULATI *et al.*, 2014). A enzima FTO controla o *splicing* do RNA regulando a capacidade do fator de *splicing* SRSF2 de ligar RNAm em uma via dependente de m^6A . Um dos alvos do SRSF2 é o fator 1 de transcrição relacionado à Runt (RUNX1T1), um fator de transcrição relacionado com adipogênese que existe sob duas isoformas: uma longa (L) e uma curta (S). A superexpressão da isoforma S de RUNX1T1 estimula a adipogênese, sugerindo que a FTO pode atuar via RUNX1T1 para aumentar a formação de adipócitos. Além disso, a FTO regula a diferenciação de adipócitos afetando a massa de gordura; e atua na adipogênese, durante a expansão mitótica, para aumentar o número de adipócitos (MERKESTEIN *et al.*, 2015).

Em humanos e animais, o gene *FTO* é expresso em todos os tecidos. A maior expressão tecidual é no cérebro, principalmente nos núcleos hipotalâmicos, as áreas de controle da homeostasia energética (GERKEN *et al.*, 2007; GULATI *et al.*, 2014). A expressão de FTO tem ação direta no controle da ingestão de energia; quando o *FTO* é superexpresso a ingestão de alimentos é reduzida, e, quando há uma redução na expressão de *FTO*, ocorre aumento na ingestão alimentar (YEO; O'RAHILLY, 2012). Paralelamente, no jejum, os níveis de expressão estão reduzidos, e, frente a dietas hipercalóricas, há um aumento na expressão do *FTO*.

O *FTO* é um gene localizado no cromossomo 16 (16q12.2; NC_000016.9 - 53737875.54148379), constituído de 9 exons e 8 introns, contendo mais de 400 kb. Todos os polimorfismos identificados até agora estão localizados no primeiro e maior intron do gene (CHEUNG; YEO, 2011). Para o presente estudo, foi selecionado o polimorfismo rs1421085, localizado numa região conservada do intron 1 e relacionado à obesidade grave em adultos e crianças (DINA *et al.*, 2007). A Figura 7 ilustra a localização e organização genômica do *FTO*.

A obesidade é um fator de risco independente para o DM (STERN; HAFFNER, 1986). Pela relação do *FTO* com a obesidade, diversos estudos vêm sendo conduzidos a fim de verificar associação de polimorfismos no *FTO* com o DM2 (FIELD *et al.*, 2007; DONEY *et al.*, 2009; LEGRY *et al.*, 2009). Todos sucedem em mostrar associação dos polimorfismos com a obesidade, mas alguns falham na

sua associação com o DM2 (FRAYLING *et al.*, 2007; XI; MI, 2009; BRESSLER *et al.*, 2010; CHAUHAN *et al.*, 2011).

Em determinadas populações, o *FTO* aumenta a suscetibilidade ao DM2 independente do efeito no ganho de peso, sugerindo que variações no ambiente ou outros fatores genéticos possam contribuir para a associação diferencial observada entre grupos étnicos (LARDER *et al.*, 2011).

Um grupo de variantes localizados no primeiro intron do gene *FTO* mostrou forte relação com índices relacionados à obesidade (DINA *et al.*, 2007; FRAYLING *et al.*, 2007; SCUTERI *et al.*, 2007).

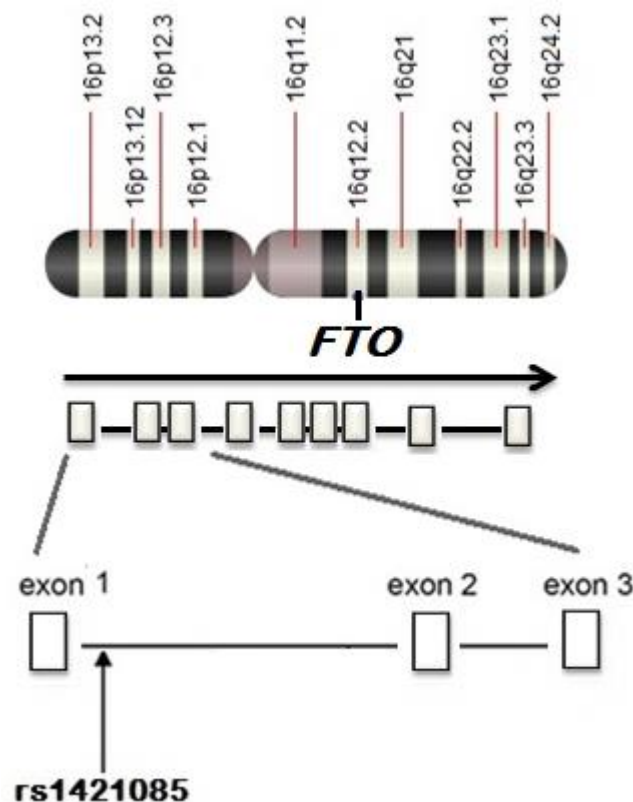


Figura 7 – Localização e estrutura genômica do gene *FTO*

O gene *FTO* apresenta 9 exons (representados pelas caixas abertas). O polimorfismo selecionado neste estudo (rs1421085) está localizado no intron 1.

Fonte: Adaptado de CHEUNG; YEO (2011).

A variante rs1421085 está associada com obesidade em adultos e crianças europeias e chinesas (WANG *et al.*, 2013) e obesidade e DM2 em afro-americanos (BRESSLER *et al.*, 2010), mas não há informação sobre sua frequência em gestantes e a associação com DMG, motivo pelo qual foi o polimorfismo selecionado neste estudo.

Recentemente, o gene *IRX3* (*Iroquois homeobox 3*), envolvido na formação do embrião em vertebrados, foi apontado como o gene funcional da obesidade, sendo o alvo dos polimorfismos do gene *FTO*. Os polimorfismos intrônicos do *FTO* interagem com a expressão do *IRX3*; portanto, cada associação entre *FTO* e obesidade é influenciada pela expressão do *IRX3* (SMEMO *et al.*, 2014).

3.10 GENE *GCKR* (GLUCOKINASE REGULATORY PROTEIN)

A glucoquinase (GCK; HK-IV; HK-D; ATP:D-hexose 6-fosfotransferase) é a enzima chave regulatória do metabolismo da glicose. Hexoquinase do tipo IV, ela exerce importante papel na regulação da glicemia pós-prandial, através de dupla função: 1) catalisar a reação de fosforilação da glicose nas células beta pancreáticas e nos hepatócitos de mamíferos, e, 2) servir como um “sensor” deste monossacarídeo para a secreção de insulina pelo pâncreas (IYNEDJIAN, 1993; TAKEDA *et al.*, 1993; MATSCHINSKY *et al.*, 2006).

Nos hepatócitos, a atividade catalítica da GCK é regulada por uma proteína de 68 kDa denominada Proteína Reguladora da Glucoquinase ou GCKRP, do inglês *Glucokinase Regulatory Protein* ou *Glucokinase (hexokinase 4) Regulator* (DE LA IGLESIA *et al.*, 1999). Esta proteína se encontra ligada à GCK dentro do núcleo, tornando a GCK inativa. Quando as concentrações de glicose plasmáticas se elevam, a GCKRP se desliga da GCK que passa à forma livre e ativa no citoplasma para fosforilar a glicose internalizada, levando à síntese de glicogênio e triglicérides. Após desempenhar sua função, a GCK volta à forma inativa ligada na GCKRP (ARDEN *et al.*, 2004).

A interação GCK com GCKRP leva à inibição da atividade enzimática e à localização nuclear da GCK. A GCKRP também estabiliza a GCK prevenindo a sua degradação, ou seja, a GCKRP é importante para regular a atividade, a concentração e a localização celular da GCK (JIN, L. *et al.*, 2015).

Além da concentração de glicose, as concentrações de frutose regulam a ligação da GCKRP com a GCK. A frutose-1-fosfato reduz a afinidade da ligação, favorecendo a ativação da GCK, enquanto que concentrações aumentadas de frutose-6-fosfato favorecem a inativação da GCK por aumentar a afinidade da ligação entre GCKRP e GCK (VAN SCHAFTINGEN; VEIGA-DA-CUNHA; NICULESCU, 1997).

A proteína GCKRP, expressa principalmente nos hepatócitos, é codificada pelo gene *GCKR*, localizado no cromossomo 2, posição 2p23 (VAN SCHAFTINGEN, 1989). O SNP rs780094 foi selecionado para estudo já que não existem dados disponíveis sobre esta variante envolvendo gestantes brasileiras com DMG. O gene *GCKR* tem 19 exons, e o polimorfismo estudado encontra-se na região do intron 16 (HAYWARD *et al.*, 1998), conforme destacado na Figura 8.

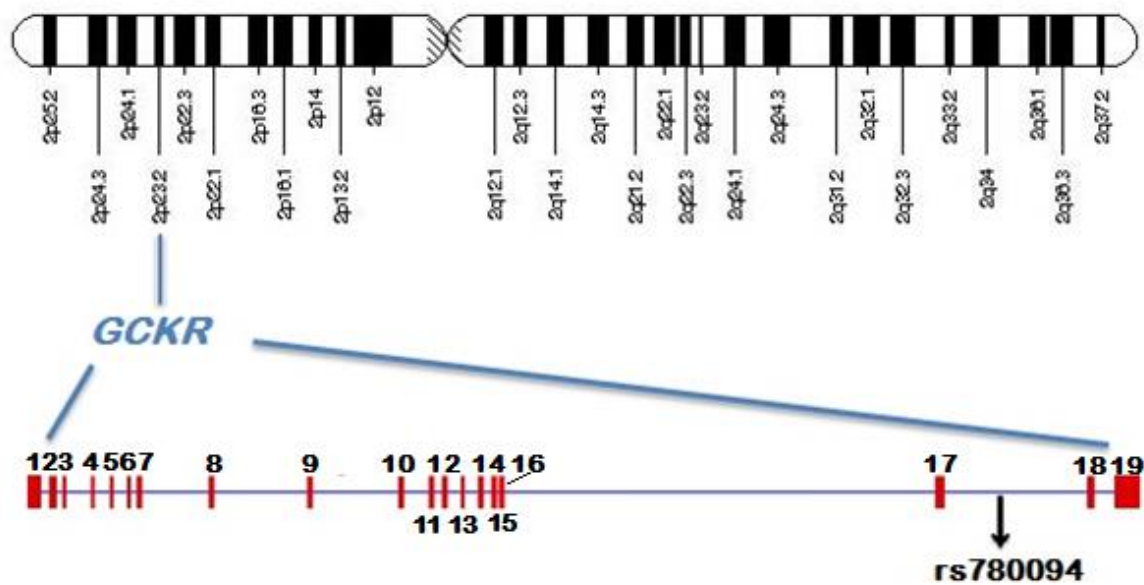


Figura 8 – Localização e estrutura genômica do gene *GCKR*.

O gene *GCKR* está localizado na posição 2p23 do cromossomo 2. Possui 19 exons (representados por barras finas), e o polimorfismo estudado (rs780094) está destacado no intron 16.

Fonte: Adaptado de <http://refgene.com/gene/2646>.

Algumas variantes no gene da *GCK* alteram a expressão de *GCKR* podendo contribuir com alterações glicêmicas (HEREDIA *et al.*, 2006; PINO *et al.*, 2007). Devido ao envolvimento da *GCK* com diabetes, e a relação da *GCKRP* com a *GCK*, os polimorfismos no gene *GCKR* também são candidatos para estudos de associação com DM (WARNER *et al.*, 1995).

O polimorfismo rs780094 do *GCKR* tem forte associação com concentrações elevadas de triglicérides (ORHO-MELANDER *et al.*, 2008; SPARSO *et al.*, 2008), ao mesmo tempo em que tem sido associado à susceptibilidade para DM2 em algumas populações, onde o alelo T confere risco reduzido (ORHO-MELANDER *et al.*, 2008; QI *et al.*, 2009; ONUMA *et al.*, 2010). Estes dados reforçam a ideia de que este polimorfismo parece alterar a atividade da *GCKRP*, resultando em aumento na

atividade da GCK, que determina a redução de glicose e aumento de triglicérides pela estimulação de genes lipogênicos pela via glicolítica (POLLIN *et al.*, 2011). Ainda, japoneses portadores do genótipo TT apresentaram concentrações de HbA1c menores do que aqueles com outros genótipos (MURATA-MORI *et al.*, 2014).

O alelo C do polimorfismo rs780094 do gene *GCKR*, ao contrário, está associado a um risco aumentado para DM2 (LING *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013). E, reforçando a premissa de que DM2 e DMG compartilham similaridades genéticas, foi encontrada associação entre o alelo de risco C do polimorfismo rs780094 do gene *GCKR* e o DMG em populações caucasianas (HUOPIO *et al.*, 2013; STUEBE *et al.*, 2014).

3.11 GENE *LEPR* (LEPTIN RECEPTOR)

A leptina é um hormônio produzido pelos adipócitos e outros tecidos como a mucosa gástrica, atuando como uma molécula sinalizadora na regulação da massa corpórea pelo tecido adiposo por *feedback* negativo. Ao chegar ao cérebro, através da corrente sanguínea, atua nos receptores hipotalâmicos promovendo a redução do apetite, o aumento de calor (estimula o gasto energético), a perda de massa corpórea, além de estimular o sistema nervoso simpático (OSWAL; YEO, 2010).

A leptina age através de receptores de leptina (Ob-Rs), que são receptores catalíticos do tipo transmembrana encontrados principalmente nos núcleos hipotalâmicos. Seis isoformas do Ob-Rs foram reconhecidas: Ob-Ra – Ob-Rf; e apenas a isoforma Ob-Rb faz transdução de sinais intracelulares. Todos os receptores têm o mesmo domínio extracelular e mesma afinidade pela leptina, mas diferem nas sequências de aminoácidos e comprimento de seus domínios intracelulares e transmembrana (TARTAGLIA *et al.*, 1995).

A isoforma solúvel do receptor, Ob-Re, é gerada por *splicing* alternativo ou por clivagem proteolítica da isoforma de membrana (LAMMERT *et al.*, 2001). A leptina pode circular na forma livre, ou ligada ao Ob-Re. Esta ligação parece postergar a ação da leptina, já que o complexo leptina-receptor solúvel aumenta o tempo de meia-vida da leptina e modula sua ação em células-alvo (CAMMISOTTO; BENDAYAN, 2012).

Os receptores de leptina são codificados pelo gene *LEPR* (*Leptin Receptor* ou Receptor de Leptina), localizado no cromossomo 1, posição 1p31.3, e constituído

por 20 exons (WINICK; STOFFEL; FRIEDMAN, 1996). O domínio extracelular do Ob-R é codificado pelos exons 3 e 17, o domínio transmembrana é codificado pelo exon 18 e o domínio intracelular, pelos exons 19 e 20 (THOMPSON *et al.*, 1997). A Figura 9 ilustra a localização e organização genômica do *LEPR*, destacando os SNPs rs1137100 e rs1137101.

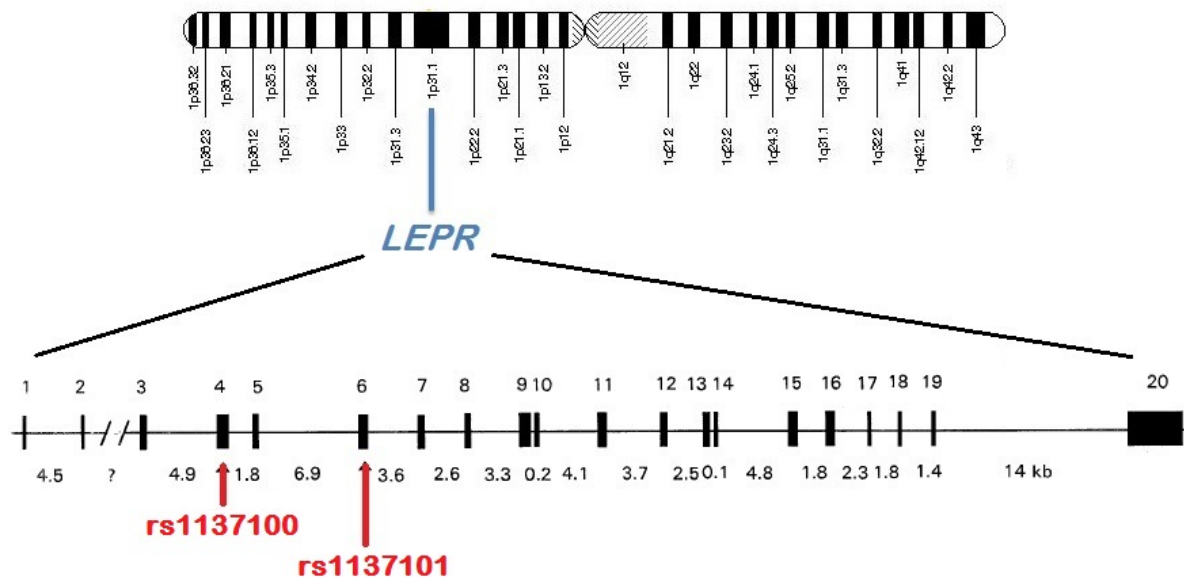


Figura 9 – Localização e estrutura genômica do gene *LEPR*.

O gene *LEPR* se localiza no braço curto do cromossomo 1 e possui 20 exons (representados pelas barras pretas). Os polimorfismos selecionados neste estudo, rs1137100 e rs1137101 estão destacados nos exons 4 e 6, respectivamente.

Fonte: Adaptado de THOMPSON *et al.* (1997).

Os receptores de leptina estão localizados principalmente no hipotálamo, mas também em tecidos e células que regulam a homeostase da glicose, como as células beta pancreáticas. Nestas células, os receptores de leptina regulam a inibição da secreção de insulina mediada pela leptina. Este comportamento torna o gene *LEPR* um candidato à associação com o DM (SALOPURO *et al.*, 2005).

A redução nas concentrações de leptina e a resistência à leptina têm sido propostas como os mecanismos fisiopatológicos da obesidade (MYERS *et al.*, 2010). A resistência à leptina parece ser resultante de defeitos no gene *LEPR*. Pela relação entre obesidade e DM, polimorfismos no *LEPR* têm sido estudados em diferentes populações (ETEMAD *et al.*, 2013), e motivou a seleção das variantes rs1137100 (Lys109Arg) e rs1137101 (Gln223Arg) para este estudo. Recentemente, o gene *LEPR* foi apontado como forte candidato para DMG (ZHANG *et al.*, 2015).

O polimorfismo rs1137100 (K109R; Lys109Arg; 326A>G) é caracterizado por uma substituição A>G, resultando na mudança de lisina para arginina no códon 109 do gene. Caucasianos com o genótipo AA têm 2 vezes mais chance de desenvolver DM2 que aqueles com outros genótipos (SALOPURO *et al.*, 2005).

O polimorfismo rs1137101 (Q223R; Gln223Arg; 668A>G) é uma substituição A>G, resultando na troca de glutamina pela arginina na posição 668 do gene *LEPR*. A presença deste polimorfismo foi considerada como fator de risco independente para DM2 entre malasianos, em especial os de origem chinesa (ETEMAD *et al.*, 2013). Este resultado já havia sido relatado quando 507 finlandeses com intolerância à glicose e portadores do genótipo GG (estudo *Finnish Diabetes Prevention Study*) apresentaram maior risco para DM2 quando comparados com aqueles portadores do alelo A (SALOPURO *et al.*, 2005).

Os polimorfismos rs1137100 e rs1137101 estão localizados na região que codifica o domínio extracelular do receptor de leptina, e a troca de aminoácido gerada pela variante afeta todas as isoformas do receptor; podendo, portanto, alterar a ação da leptina sobre a insulina (SALOPURO *et al.*, 2005).

Polimorfismos em genes envolvidos com o metabolismo da leptina podem estar associados às complicações durante a gestação, como pré-eclampsia e DMG. Uma meta-análise apontou forte associação do SNP rs1137100 do *LEPR* com o risco de gestantes desenvolverem pré-eclampsia (FONG *et al.*, 2014). As concentrações de leptina aumentam durante a gestação, e devem voltar ao normal após o parto, confirmando que além do tecido adiposo, a placenta é uma das principais fontes de leptina durante a gestação (TENNEKOON *et al.*, 2012).

3.12 GENE *MMP9* (MATRIX METALLOPEPTIDASE 9)

Dentre as proteases envolvidas na clivagem proteolítica do RAGE, será destacada neste trabalho a metaloprotease de matriz 9 (MMP9) pelo fato dela já ter sido reportada na literatura associada às complicações do DM (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001; ZHANG *et al.*, 2008; METZ *et al.*, 2012; SYMEONIDIS *et al.*, 2013). Uma das vias de associação entre MMP9 e DM é a formação de AGEs. O aumento de AGEs estimula a expressão de RAGE e aumenta a expressão de NF- κ B; o qual ativa a MMP9. Esta, por sua vez, promove a clivagem proteolítica do RAGE de membrana (ZHU *et al.*, 2012).

A MMP9 (também denominada *matrix metallopeptidase 9*, *gelatinase B*, *92 kDa gelatinase*, *92 kDa type IV collagenase*) é uma enzima extracelular zinco dependente que degrada a membrana e outros componentes da matrix extracelular. A MMP9 digere, predominantemente, gelatina, mas também elastina, colágeno, laminina e fibronectina (SYMEONIDIS *et al.*, 2013).

A alteração da matriz extracelular pela ação da MMP9 pode contribuir para o surgimento das complicações do DM. A atividade aumentada de MMPs já foi associada com a disfunção endotelial presente em aneurismas, na ruptura da placa de ateroma e na nefropatia diabética (PEETERS *et al.*, 2015). Altas concentrações de MMP9 também já foram associadas à retinopatia diabética (JACQUEMINET *et al.*, 2006), podendo, então, servir de marcador de complicações vasculares do DM (THRAILKILL *et al.*, 2010). A MMP9 é expressa em vários tipos celulares e altas concentrações de glicose podem modificar sua expressão gênica e sua atividade (DEROSA *et al.*, 2007).

Polimorfismos no gene *MMP9* afetam a expressão e a atividade da MMP9, e estão associados às doenças cardiovasculares tanto em brancos quanto em negros (BELO *et al.*, 2012; METZGER, I. F. *et al.*, 2012). Esta associação não foi verificada em chineses (WU *et al.*, 2013).

O gene *MMP9* está localizado no braço longo do cromossomo 20, posição 11.2-13.1, contém 13 exons e 12 introns (TAMBO *et al.*, 2014). O polimorfismo rs17576 (Q279R; Gln279Arg) do gene *MMP9*, está localizado no exon 6, é uma mutação *missense* (não-sinônima), codificando glutamina ao invés de arginina (A>G). Esta variação altera a conformação da proteína e sua atividade enzimática, podendo alterar as concentrações de sRAGE (HU *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2010). A Figura 10 ilustra a localização e organização genômica do *MMP9*.

O polimorfismo rs17576 está localizado na região de ligação do substrato e sua presença reduz a afinidade de ligação com colágeno do tipo IV. Com isso, ocorre acúmulo de proteínas da matriz extracelular, causando dano tecidual (NAZIR *et al.*, 2014). A presença deste SNP conferiu risco aumentado para nefropatia diabética entre indianos com DM2 (AHLUWALIA *et al.*, 2009). Este dado estimulou a escolha deste polimorfismo, para verificarmos possíveis correlações entre o SNP e as complicações vasculares dos participantes com DM.

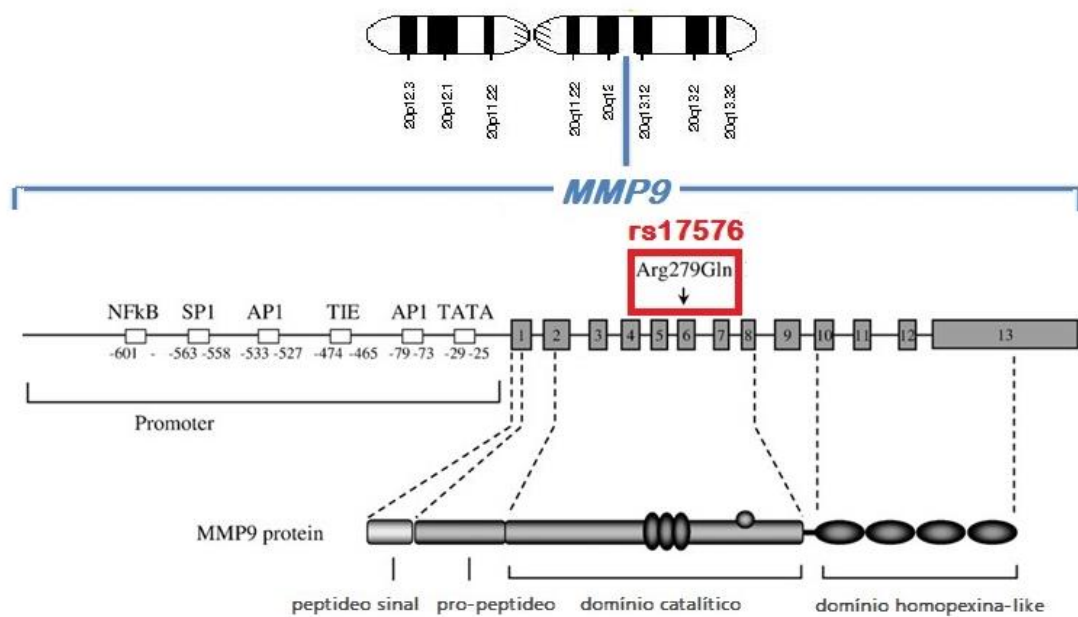


Figura 10 – Localização e estrutura genômica do gene *MMP9*.

O gene *MMP9* está localizado no braço longo do cromossomo 20 (entre as posições 11.2 e 13.1). Possui 13 exons (representados pelas caixas cinza). O polimorfismo rs17576 está destacado no exon 6, mesma região do sítio de ligação com substrato.

Fonte: Adaptado de YE (2006).

3.13 GENE *PPARg* (PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR)

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma, conhecidos como PPARs (*Peroxisome Proliferator-activated Receptor*) são proteínas pertencentes à superfamília de receptores nucleares hormonais, que funcionam como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes. Os PPARs desempenham um papel essencial na regulação da diferenciação celular e metabolismo da glicose, de lipídeos e inflamação (VARGA; CZIMMERER; NAGY, 2011).

Estão descritos 3 subtipos de PPARs, codificados por genes distintos: α (alfa), β/δ (beta/delta) e γ (gama). Os PPARs controlam a expressão gênica pela ligação a elementos responsivos específicos (PPREs) localizados na região promotora. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-cis retinóico, RXR (TYAGI *et al.*, 2011). O PPAR γ , também denominado PPARg, desempenha um papel importante na diferenciação do tecido adiposo (adipogênese) e na sensibilização à insulina (HEUDE *et al.*, 2011). O PPARg é um mediador da ligação entre os metabolismos lipídico e glicêmico. Frente a longos períodos de hipoglicemia, os PPARs estão

envolvidos no suprimento de ácidos graxos e corpos cetônicos do tecido adiposo como fonte de energia (JANANI; RANJITHA KUMARI, 2015).

O PPARg tem sido associado a diversas patologias, como obesidade, diabetes (WALCZAK; TONTONNOZ, 2002), aterosclerose (HSUEH; LAW, 2001), doenças digestivas inflamatórias (LEWIS *et al.*, 2001), artrite reumatoide (JI *et al.*, 2001), mal de Alzheimer (LANDRETH; HENEKA, 2001), câncer de mama (PIGNATELLI *et al.*, 2001) e de cólon (AUWERX, 2002). Agonistas do PPARg têm sido utilizados no tratamento da dislipidemia e hiperglicemia (LI, Y. *et al.*, 2008).

O gene *PPARg* foi mapeado no cromossomo 3 (Figura 11), região 3p25, e origina 4 RNAm diferentes: PPARg1, PPARg2, PPARg3 e PPARg4, que diferem em sua extremidade 5' como consequência de diferentes promotores e do *splicing* alternativo. Os 4 RNAm traduzem 2 isoformas proteicas, a PPARg1 e PPARg2 (FAJAS *et al.*, 1997).

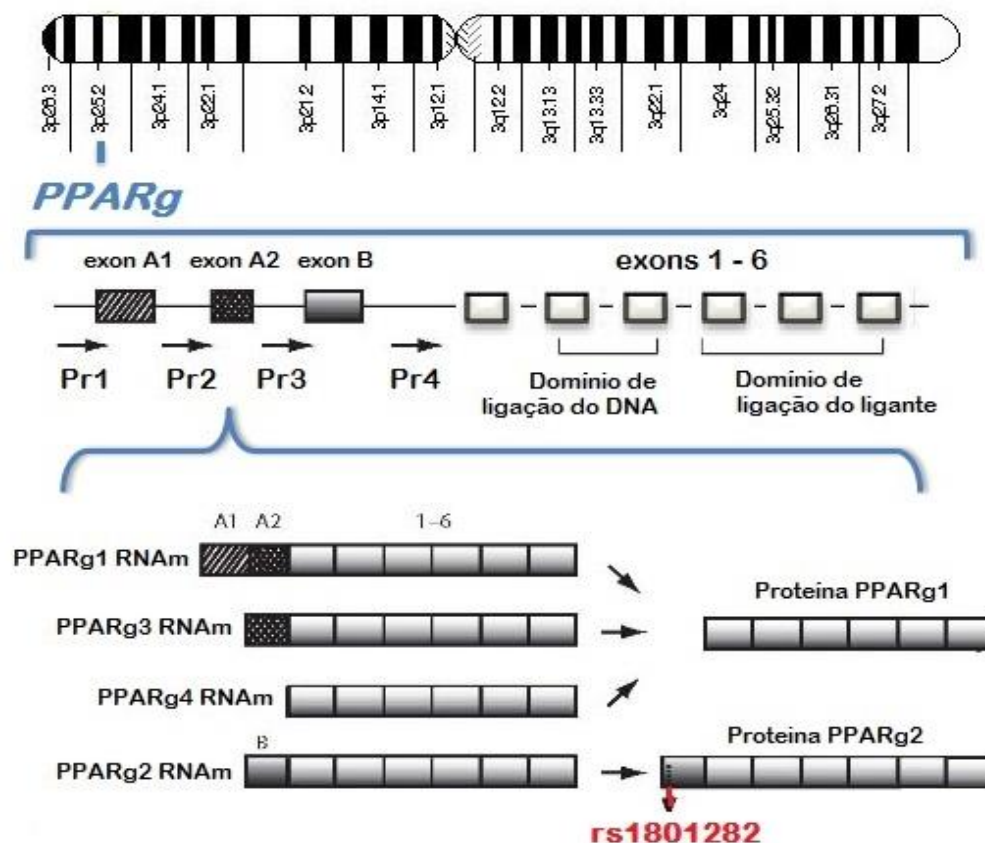


Figura 11 – Localização e estrutura genômica do gene *PPARg*.

O gene *PPARg* está localizado no cromossomo 3 (posição 3p25), e apresenta 9 exons (representados pelas caixas cinzas e brancas na parte central da figura). Ele origina 4 RNAm diferentes, que traduzem 2 isoformas proteicas: PPARg1 e PPARg2. A isoforma PPARg1 é resultante de *splicing* alternativo do RNAm do PPARg1, PPARg3 e PPARg4. A isoforma PPARg2 tem 30 aminoácidos a mais na sua parte N-terminal. O polimorfismo rs1801282 se encontra no exon B e está presente apenas na isoforma PPARg2.

Fonte: Adaptado de FAJAS *et al.* (1997) e MEIRHAEGHE *et al.* (2003).

Mutações comuns no gene *PPARg* têm sido associadas à obesidade e a fenótipos relacionados ao DM (DEEB *et al.*, 1998; MEIRHAEGHE *et al.*, 1998; DONEY *et al.*, 2004). O polimorfismo rs1801282 (Figura 11) do gene *PPARg*, resulta na substituição da prolina por alanina no códon 12 do exon B (C>G; Pro12Ala). Este polimorfismo causa uma mudança conformacional na proteína, e a presença do alelo menos frequente está associada a uma redução da atividade do *PPARg* (HARA *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE; AMOUYEL, 2004).

Pacientes com DM2 homozigotos para o alelo menos frequente G apresentam a circunferência abdominal maior quando comparados com indivíduos com outros genótipos, sendo a presença da variante rs1801282 do *PPARg* um efeito independente na circunferência abdominal (KRZLIAK *et al.*, 2015).

O alelo C do rs1801282 está associado com aumento da atividade transcricional do *PPARg* e, conseqüente, aumento da sensibilidade à insulina. A associação com DM2 é controversa, já que estudos encontraram associação positiva, enquanto em outros, a presença da variante conferiu proteção contra DM2 (SANGHERA *et al.*, 2008; GROOP; POCIOT, 2014)

O alelo menos comum do polimorfismo rs1801282 foi associado com baixo peso do feto ao nascimento, causado primariamente pela menor duração da gestação. O polimorfismo pode representar um fator de susceptibilidade genética para o nascimento prematuro e constitui um elo entre o nascimento prematuro e doenças metabólicas ao longo da vida do indivíduo (MEIRHAEGHE *et al.*, 2007).

Alguns estudos descritos na literatura não encontraram associação do SNP rs1801282 com DMG (LAUENBORG *et al.*, 2009; PAPPA *et al.*, 2011). Ao contrário, Heude e colaboradores (2011) ao estudar este polimorfismo em conjunto com o polimorfismo C1431T encontrou associação com o DMG em francesas. Quando estavam presentes o alelo menos frequente do rs1801282 e o alelo C do C1431T (haplótipo G-C), foi observado um efeito protetor contra o desenvolvimento de DMG.

Em estudo conduzido na Turquia, o mesmo polimorfismo não teve efeito na prevalência de DMG ou nas concentrações glicêmicas das gestantes, mas observou-se impacto da variante no peso das gestantes com DMG (TOK *et al.*, 2006).

3.14 GENE *RAGE* (RECEPTOR FOR AGE)

O gene *RAGE* humano foi mapeado no cromossomo 6 (VISSING *et al.*, 1994), posição 6p21.3, sendo localizado no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) entre as regiões de classe II e de classe III (GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769). Este gene é composto de 1,7 kb, 11 exons e 10 introns de tamanho variável e uma região 3'UTR que pode se estender por até 4 kpb, conforme ilustrado na Figura 12 (SUGAYA *et al.*, 1994).

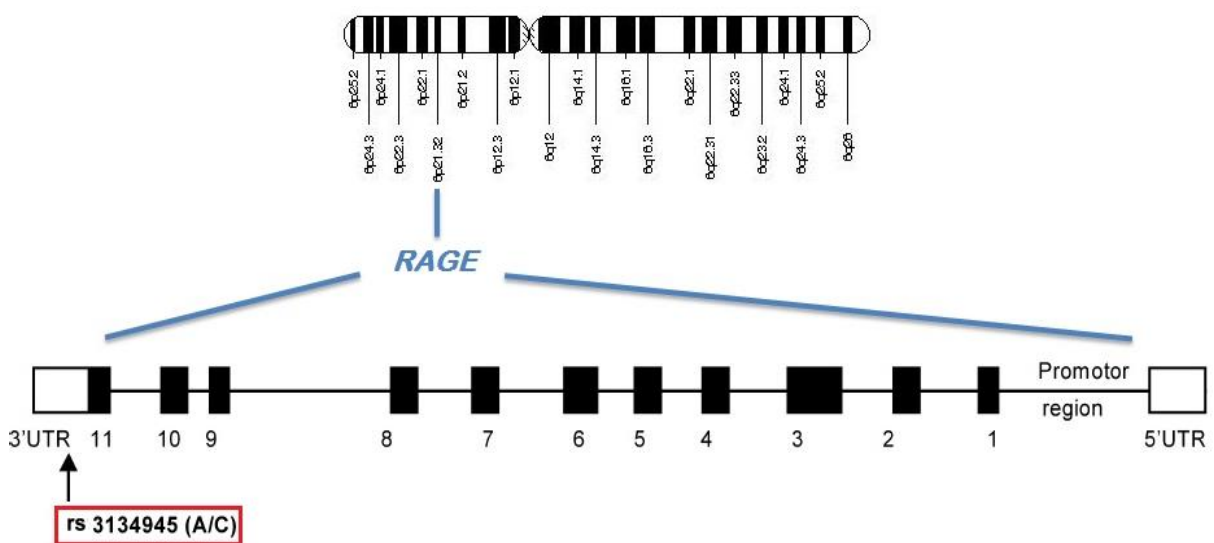


Figura 12 – Localização e estrutura genômica do gene *RAGE*.

O gene *RAGE* está localizado no cromossomo 6 (posição 6p21.3), e é composto por 11 exons (representados por caixas pretas). Os introns e a região promotora estão representados por linhas pretas, e as caixas abertas representam as regiões não traduzidas 3' e 5'. O polimorfismo selecionado neste trabalho está destacado na região não traduzida 3'.

Fonte: Adaptado de Gaens e colaboradores (2008).

O RAGE pode ser expresso de forma constitutiva ou induzida em diferentes células, como adipócitos, células do sistema imune, células endoteliais e células beta pancreáticas (STERENCZAK; NOLTE; MURUA ESCOBAR, 2013). A expressão vai depender do tipo celular e do estágio do desenvolvimento celular (BRETT *et al.*, 1993; HORI *et al.*, 1995). Durante a fase de desenvolvimento embrionário RAGE é altamente expresso de maneira constitutiva e na fase adulta de maneira regulada (BRETT *et al.*, 1993). Isto significa que a expressão de RAGE pode ser induzida em situações de acúmulo de ligantes e mediadores inflamatórios (HUTTUNEN; FAGES; RAUVALA, 1999; SCHMIDT *et al.*, 2001). Assim, o aumento da expressão de RAGE é visto em um grande número de estados patológicos, incluindo DM, doença

cardiovascular, câncer e disfunções neurais (BRETT et al., 1993; WENDT et al., 2003; TANJI et al., 2000; RITTHALER et al., 1995). A regulação de adiposidade e da inflamação mediada por RAGE provavelmente está associada ao DM2 e suas complicações vasculares (YAMAMOTO; YAMAMOTO, 2013).

Mais de 50 variantes genéticas estão descritas para o gene RAGE (HANCOCK et al., 2010; KALOUSOVA et al., 2010; LU, W.; FENG, 2010). Os polimorfismos funcionais, incluindo a variação no códon 82 (G82S, rs 2070600) resultante da substituição do aminoácido glicina por serina no domínio V e dois sítios polimórficos na região promotora, o -429T>C (rs 1800625) e -374T>A (rs 1800624) têm sido extensivamente estudados em associação a patologias (HUDSON et al., 2001). O alelo -374A do promotor do *RAGE* tem sido associado como protetor contra danos macrovasculares em paciente com DM2 (PICHETH et al., 2007a; LU, W.; FENG, 2010) e o alelo -429C, com o DM1 (PICHETH et al., 2007b). Mais recentemente, um estudo de associação ampla de genomas (GWAS) mostrou associação do polimorfismo G82S com a piora da função pulmonar (HANCOCK et al., 2010).

Também foram encontradas associações de polimorfismos no gene *RAGE* com tumores de mama (TESAROVA et al., 2007), de pâncreas (KRECHLER et al., 2010), tumores gástricos (GU et al., 2008), esclerose múltipla (LI, K. et al., 2011) e complicações do DM (KALOUSOVA et al., 2010). O polimorfismo rs3134945 do *RAGE*, selecionado neste estudo, está destacado na Figura 12.

A funcionalidade do polimorfismo rs3134945 ainda não está clara, mas indivíduos com o alelo C parecem apresentar maiores concentrações de glicemia em jejum, de glicemia pós sobrecarga e de insulina (GAENS et al., 2008).

3.15 GENE *TCF7L2* (TRANSCRIPTION FACTOR 7- LIKE 2)

O fator de transcrição 7- semelhante a 2, *TCF7L2* (*Transcription factor 7- like 2*) está envolvido na via de sinalização da Wnt. O nome Wnt é derivado de *Wg* (do gene de polaridade segmentar *Wingless*, em virtude do fenótipo mutante das moscas sem asas) e *int* (gene *int* de camundongo que codifica a proteína Proto-Oncogênica int-1 – ativado pela integração de um vírus próximo ao gene). A via de sinalização Wnt é uma cascata de sinal de transdução altamente conservada, que

tem um papel central no desenvolvimento embrionário e na regeneração de tecidos (IP *et al.*, 2012).

As Wnt são glicoproteínas secretadas por diversas células, que se ligam aos receptores de superfície celular, desempenhando papel importante na embriogênese e no controle da proliferação das células beta pancreáticas (ZHOU *et al.*, 2014), assim como na homeostase da glicose e secreção da insulina. Anormalidades na via de sinalização Wnt podem levar ao desenvolvimento de tumores e outras doenças, incluindo DM2 (CLEVERS, 2006; YANG, 2012).

As proteínas Wnt se ligam aos receptores de superfície celular da família FZD (anteriormente denominados *Frizzled*) e LRP (*Lipoprotein-Related Protein*) e ativam, ao menos, 3 vias de sinalização intracelulares, sendo a principal a via de sinalização efetora Wnt/beta-catenina ou via Wnt canônica. Na ausência das Wnts a beta-catenina é rapidamente fosforilada pela proteína GSK3B (*Glycogen Synthase Kinase 3beta*) e degradada. Quando ativadas pela ligação de Wnt, as proteínas FZD impedem que a GSK3B degrade a beta-catenina, e isso faz com que suas concentrações intracelulares aumentem (IP; CHIANG; JIN, 2012). Em altas concentrações, a beta-catenina se liga aos receptores nucleares TCF7L2, com ativação de genes e proteínas envolvidos na proliferação e diferenciação celular, e na expressão e secreção de GLP-1, peptídeo semelhante ao glucagon 1, que tem como principal função o estímulo da secreção de insulina (YI; BRUBAKER; JIN, 2005; JIN, T.; LIU, 2008).

Estes mecanismos reforçam o papel essencial do TCF7L2 na secreção de insulina pelas células pancreáticas em resposta à glicose e incretinas (SHU *et al.*, 2008). Ainda, a expressão de TCF7L2 em adipócitos é regulada pela insulina (AHLZEN *et al.*, 2008). Norton e colaboradores (2011) mostraram que o TCF7L2 constitui um regulador negativo potencial da gluconeogênese. A relação entre o TCF7L2 e o metabolismo da glicose também é reforçada pela relação entre a expressão do gene de insulina e a expressão de TCF7L2 (LYSSENKO *et al.*, 2007). A expressão de GLP-1 e do receptor do peptídeo inibitório gástrico (GIP – *gastric inhibitory polypeptide*) depende da presença do fator de transcrição TCF7L2, fornecendo uma explicação plausível para o envolvimento deste gene na responsividade das células beta às incretinas (SHU *et al.*, 2009).

O gene *TCFL2* está localizado na posição 10q25.3 do cromossomo 10 e possui 17 exons (IP; CHIANG; JIN, 2012). A Figura 13 representa a estrutura do gene e a localização do polimorfismo estudado.

Pelo envolvimento do *TCF7L2* na estimulação da proliferação das células-beta pancreáticas e na produção do GLP-1, e, conseqüentemente, na glicemia, ele é um gene candidato para associação com o DM. Para este estudo a variante rs7901695 (g.49080T>C) foi selecionada.

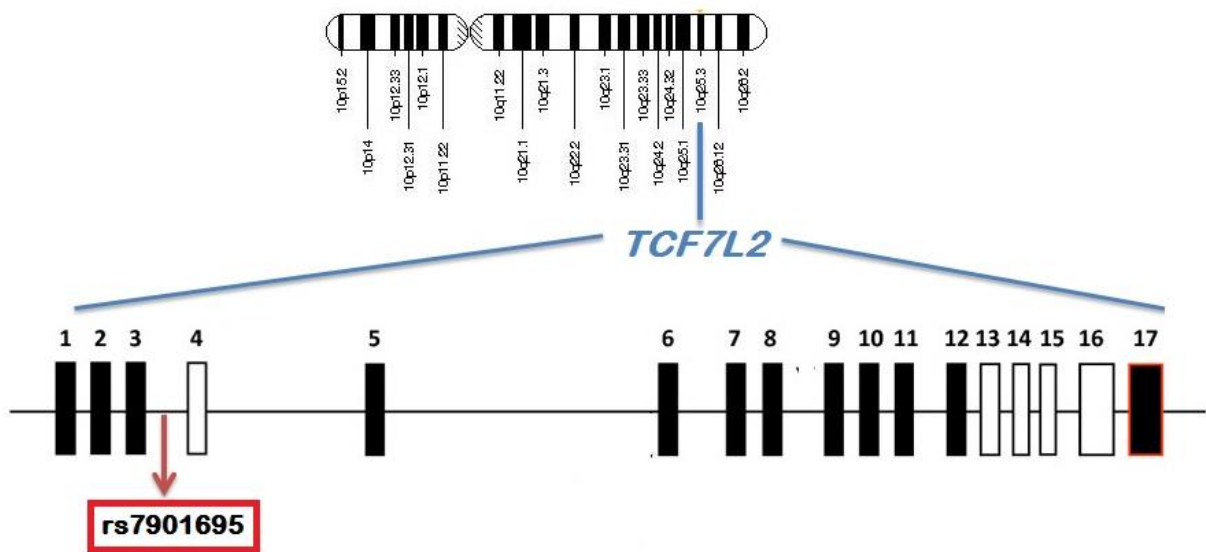


Figura 13 – Localização e estrutura genômica do gene *TCF7L2*.

O gene *TCF7L2* está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25.3) e é composto por 17 exons, onde as barras pretas representam os exons constitutivos, e as caixas brancas, os exons alternativos. O polimorfismo estudado (rs7901695) está destacado no intron 3.

Fonte: Adaptado de IP; CHIANG; JIN (2012).

O *TCF7L2* é um gene que apresenta associação muito forte com o DM2 (DABELCA *et al.*, 2011). Variantes comuns na região intrônica do gene *TCF7L2* foram apontadas como fortes preditores de risco genético para o DM2 (CAUCHI *et al.*, 2007).

As variantes mais significantes foram detectadas para dois polimorfismos intrônicos, rs7903146 e rs12255372, localizados a 50 pb um do outro; mas vários SNPs localizados em outras regiões do gene *TCF7L2* foram associados ao DM (GRANT *et al.*, 2006; GROVES *et al.*, 2006; HUMPHRIES *et al.*, 2006; SAXENA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; CHANDAK *et al.*, 2007; SCOTT, L. J. *et al.*, 2007; ZEGGINI *et al.*, 2007; TABARA *et al.*, 2009).

Para cada cópia do alelo T do polimorfismo rs7903146 do gene *TCF7L2* foi relatado um risco aproximado 1,5 vezes maior para o desenvolvimento de DM2 (CORNELIS *et al.*, 2009). Vários outros estudos confirmaram que o alelo T é responsável pelo risco aumentado para DM, provavelmente por causar prejuízos na secreção de insulina e aumento da produção de glicose hepática pela superexpressão do gene nas ilhotas (WANG *et al.*, 2013; SHOKOUHI *et al.*, 2014).

A variante rs7901695, estudada em menor frequência, também mostrou associação com DM2 em indianos e suecos (MAYANS *et al.*, 2007; SANGHERA *et al.*, 2008). Em italianos, além da forte susceptibilidade para o DM2, o polimorfismo também esteve associado com risco cardiovascular (CICCACCI *et al.*, 2013).

Já com relação ao DMG, foi encontrada associação do polimorfismo rs7903146 com o risco de desenvolvimento de DMG em mulheres escandinavas, e o alelo T conferiu um risco 2 vezes maior para DMG (SHAAT *et al.*, 2007).

O alelo T do SNP rs7901695 conferiu risco aumentado para DMG em americanas de origem caucasiana, com uma razão de chance de 1,98 (STUEBE *et al.*, 2014). Já em suecas com DMG foram genotipadas para polimorfismos comuns do *TCF7L2* e os genótipos CT e CC do rs7901695 tiveram forte associação com DMG, mesmo após ajustes para idade materna, número de gestações, histórico familiar de DM e genótipos HLA-DQ (PAPADOPOULOU *et al.*, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (número CAAE: 01038112.0.0000.0102), foram envolvidos neste estudo 1.325 participantes: 635 foram recrutados no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e 438 na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-UFPR (SEMPR), os quais aderiram voluntariamente através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 1); e, 252 participantes foram selecionados das amostras do biorrepositório do Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná.

A criação de um novo biorrepositório com as amostras dos 1.073 participantes provenientes do HC-UFPR foi baseada na Portaria N^o 2.201, de 14 de setembro de 2011. Todas as amostras possuem DNA extraído e estocado em freezer -20°C e aproximadamente 20 biomarcadores foram quantificados em cada uma delas. As amostras estão estocadas em alíquotas de 1mL em freezer -20°C e -80°C.

Para formar o grupo controle para os casos DM1 e DM2, foram incluídos doadores de sangue saudáveis, com idade entre 18 e 69 anos, de ambos os sexos. Candidatos à doação que declararam durante a triagem clínica apresentar qualquer tipo de DM, hipertensão, doença renal, doenças da tireóide e/ou estarem em uso contínuo de qualquer medicamento foram excluídos.

Após o processamento das amostras, foram excluídas do presente estudo aquelas com pequena quantidade de soro ou plasma, com hemólise e/ou lipemia intensa ou com concentração reduzida de DNA genômico (<100ng/μL).

Classificação e caracterização da amostra

Após a aplicação dos critérios de exclusão e pareamento dos grupos por sexo (DM1 e DM2) e idade (DMG), a amostra em estudo foi dividida em dois grandes grupos caso-controle, conforme ilustrado na Figura 14.

Os grupos foram caracterizados conforme classificação proposta pela ADA (2012).

Coleta de sangue e processamento das amostras

Após a coleta de sangue, os tubos com gel separador (BD Vacutainer® SST™; Becton, Dickinson and Co) e com fluoreto de sódio (BD Vacutainer® NaF Na₂EDTA; Becton, Dickinson and Co) foram submetidos à centrifugação a 3500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Os tubos contendo o anticoagulante EDTA K₂ (BD Vacutainer® K₂EDTA; Becton, Dickinson and Co) foram homogeneizados por 15 minutos antes das análises de HbA1c.

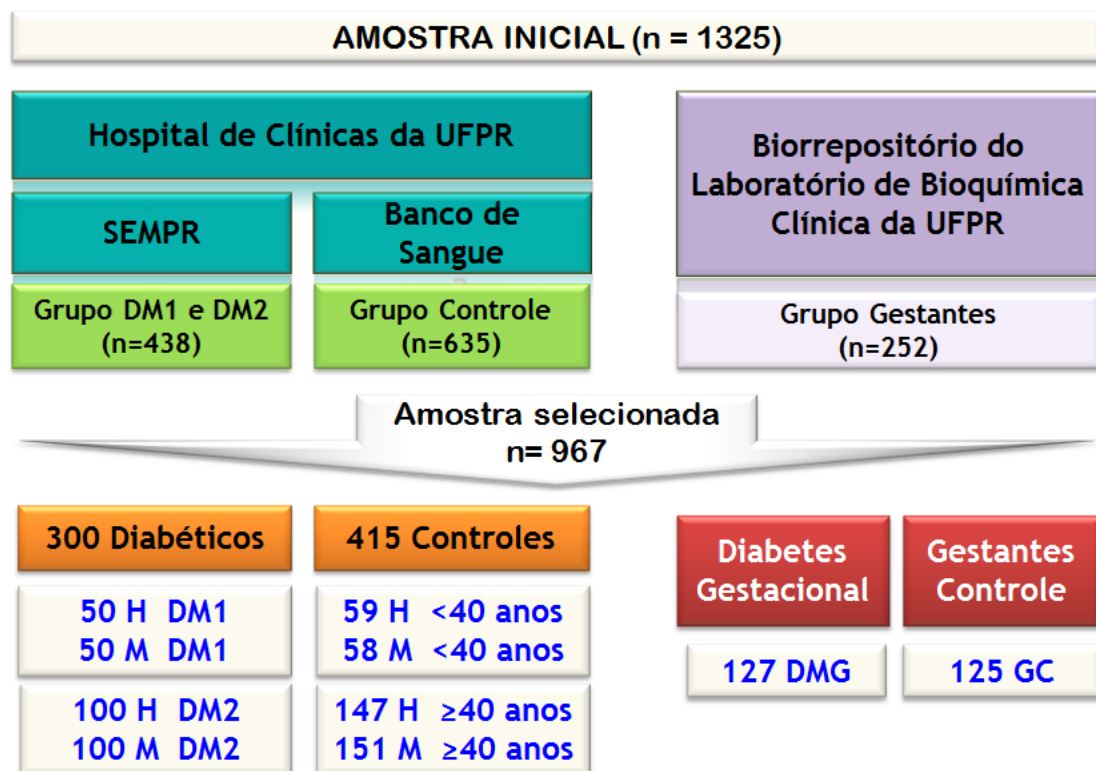


Figura 14 – Caracterização da amostra em estudo.

Os grupos foram formados a partir da seleção de participantes com DM1 e DM2 e controles saudáveis, pareados por gênero e idade; e gestantes com DMG e saudáveis, pareadas pela idade. HC-UFPR, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, SEMPR, Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-UFPR. H, homens. M, mulheres. GC, gestantes controle.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico, obtido de leucócitos, foi extraído pelo método *Salting Out* com modificações (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5 a 2,0%) com identificação dos fragmentos com brometo de etídio (ou *SYBR gold*) e

fotodocumentado com câmara CCD em sistema *BioChem* (*UVP inc.*). A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260nm e 280nm (*NanoDrop®*, *Thermo Scientific*), sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 100 ng/μL e razão A_{260}/A_{280} menor que 1,8 ou superior a 2,0, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

As amostras de DNA foram diluídas à concentração final de 100 ng/μL com água ultrapura estéril e, armazenadas em freezer a -20°C. Para as análises de genotipagem pelo sistema TaqMan[®], as amostras foram diluídas à concentração final de 20 ng/μL com água ultrapura estéril e armazenadas em freezer a -20°C.

4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL

Neste trabalho, polimorfismos de nucleotídeo único nos genes *RAGE* e *MMP9* foram estudados nos grupos com DM1 e DM2 e respectivos controles. No grupo de gestantes com e sem DMG, foram estudadas variações nos genes *FTO*, *GCKR*, *LEPR*, *PPAR γ* e *TCF7L2*, previamente associadas à susceptibilidade para DM2 e DMG. Não temos conhecimento de dados reportados na literatura sobre a frequência alélica e genotípica desses polimorfismos selecionados na população do sul do Brasil, fato que motivou o desenho experimental deste estudo.

As genotipagens dos polimorfismos selecionados para este estudo foram realizadas utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. A PCR em tempo real (qPCR) empregada nas análises foi o sistema TaqMan[®] (*Applied Biosystems*, *Foster City, CA, USA*), que utiliza a reação de amplificação em cadeia da polimerase e a discriminação alélica com sondas marcadas com diferentes fluoróforos (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011). A Tabela 2 sumariza as características dos polimorfismos estudados e da PCR em tempo real por TaqMan[®].

O preparo da reação para a PCR em tempo real foi realizado conforme protocolos otimizados, e as condições de termociclagem e reagentes empregados estão detalhados na Tabela 3. Em cada placa foram adicionados dois controles negativos, contendo apenas a mistura de reação (sem DNA), e um controle positivo de cada genótipo (amostra de DNA com genótipo conhecido) para cada uma das variantes estudadas.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICA DOS POLIMORFISMOS E DA REAÇÃO DE qPCR

Designação OMIM	Gene	Cromossomo Posição	Localização Região	Polimorfismos		TaqMan®
610966	<i>FTO</i>	16q12.2	Intron 1	rs1421085	C>T	C___8917103_10
600842	<i>GCKR</i>	2p23.3	Intron 16	rs780094	C>T	C___2862873_10
601007	<i>LEPR</i>	1p31.3	Exon 4	rs1137100	A>G	C___518168_20
			Exon 6	rs1137101	A>G	C___8722581_10
120361	<i>MMP9</i>	20q13.1	Exon 6	rs17576	A>G	C___11655953_40
601487	<i>PPARg</i>	3p25.2	Exon B	rs1801282	C>G	C___1129864_10
600214	<i>RAGE</i>	6p.21.3	UTR 3'	rs3134945	A>C	C___22274952_40
602228	<i>TCF7L2</i>	10q25.2-q25.3	Intron 3	rs7901695	C>T	C___384583_10

SNP: single nucleotide polymorphism; *FTO*: fat mass and obesity associated gene; *GCKR*: glucokinase (hexokinase 4) regulator gene; *LEPR*: leptin receptor gene; *MMP9*: matrixmetalloproteinase 9 gene; *PPARg*: peroxisome proliferator-activated receptor gene; *RAGE*: receptor for AGE gene; *TCF7L2*: transcription factor 7-like 2 gene.

rs: reference sequence (sequência de referência do SNP).

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man®.

Fonte: (NCBI, 2013; OMIM, 2014).

TABELA 3 – CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA A REAÇÃO DE qPCR

Reagentes	Volume para reação de 8µL
Sonda TaqMan® *	0,1µL
Master Mix **	3,0µL
Água ultrapura estéril	1,9µL
DNA (20ng/µL)	3,0µL
Ciclos térmicos para os genes <i>RAGE</i> e <i>MMP9</i>	1 ciclo Pré-PCR: 60°C/1 min. 1 ciclo: 95°C/10min. 45 ciclos: 95°C/15seg + 60°C/1min30seg. 1 ciclo Pós-PCR: 60°C/30seg.
Ciclos térmicos para os genes <i>FTO</i> , <i>GCKR</i> , <i>LEPR</i> , <i>PPARg</i> e <i>TCF7L2</i>	1 ciclo Pré-PCR: 60°C/1 min. 1 ciclo: 95°C/10min. 45 ciclos: 95°C/15seg + 60°C/2min. 1 ciclo Pós-PCR: 60°C/30seg.

* Sonda: TaqMan® SNP Genotyping Assays - Life Technologies, contendo um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), marcados com fluoróforos distintos.

** Master Mix: reagente comercial contendo DNA polimerase AmpliTaq Gold® ultra-pura, desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), referência passiva ROX™ e tampão.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS

As biomoléculas associadas ao diabetes e à inflamação foram quantificadas a fim de buscar por biomarcadores de risco ou proteção associados com o DM e DMG. Amostras de sangue foram obtidas em tubos de coleta a vácuo, sendo 5 mL na presença de gel separador e ativador da coagulação (BD Vacutainer® Clot Activator) para a maioria das determinações bioquímicas; 4 mL em tubo com fluoreto de sódio (BD Vacutainer® NaF Na₂EDTA) para determinação de glicemia e 4 mL em tubo contendo anticoagulante EDTA (BD Vacutainer® K₂EDTA) para determinação da hemoglobina glicada (HbA1c). Amostras hemolisadas, lipêmicas e ictéricas foram excluídas.

As amostras coletadas em tubo com gel separador foram centrifugadas por 15 minutos a 3200 x g, e, após centrifugação, alíquotas (~1,5mL) foram estocadas em freezer a -20°C e a -80°C (biorrepositório). As amostras coletadas em tubos com fluoreto foram processadas da mesma maneira, no entanto o plasma foi utilizado imediatamente após a centrifugação para a determinação da glicemia, a fim de evitar a glicogenólise e alteração nos resultados da glicemia. As amostras coletadas nos tubos com EDTA foram estocadas a -20°C por no máximo 1 mês. Antes de serem analisadas, todas foram homogeneizadas por 30 minutos.

Os ensaios laboratoriais foram realizados em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Laboratórios do Brasil) ou Labmax 400 (Labtest SA), empregando-se reagentes, calibradores e controles recomendados pelos fabricantes. As determinações de HbA1c foram realizadas em sistema automatizado Cobas Integra® 400 Plus (Roche Diagnostica Brasil), com o reagente A1C-2 Tina-Quant® Hemoglobin A1c Gen 2, método certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Os princípios dos métodos e reagentes utilizados estão descritos na Tabela 4.

Através de entrevista direta e análises de prontuário médico foram coletados dados antropométricos, conforme formulário em anexo (Anexo 2). A obesidade, caracterizada pelo excesso de massa gorda, pode ser verificada de maneira simples pelo Índice de Massa Corpórea (IMC). A OMS enquadra um adulto em classes de peso, de acordo com o IMC obtido pelo peso (em Kg) dividido pela altura ao quadrado (em metros; m²).

TABELA 4 – PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS E VALORES DE REFERÊNCIA

Exame	Princípio do Método	Reagente/ Equipamento	CVa (%)	Intervalo de Referência
1,5 anidroglucitol	Enzimático Glycomark	<i>Glycomark® To men America Inc. USA</i>	3,4	>10 µg/mL
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6- tribromo-3- hidroxibenzóico	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	1,6	2,6 – 6,0 mg/dL
Albumina	Reação com verde de bromocresol	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	1,3	3,5 – 5,0 g/dL
Colesterol Total*	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	1,3	<200 mg/dL
Creatinina	Picrato alcalino cinético	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	3,2	0,6–1,1 mg/dL
Glicose	Hexoquinase	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	1,71	<100 mg/dL
HbA1c	Imunoturbidimétrico	<i>Roche Diagnostica Brasil</i>	0,74	4,0 – 6,0%
HDL- colesterol*	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	5,1	Desejável: > 60 mg/dL Baixo: < 40 mg/dL
LDL- colesterol*	Equação de Friedewald $LDL-C = Col - HDL-c - TG/5$			<130 mg/dL
PCR-us	Imunoturbidimétrico	Labtest	5,3	Risco <1,0 mg/L: baixo 1,0-3,0 mg/L: moderado >3,0 mg/L: alto
Proteínas Totais	Reação do Biureto	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	1,4	6,0 – 8,0 g/dL
Triglicerídeos*	Ensaio enzimático com lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase com Reação de Trinder	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	1,6	< 150 mg/dL
Uréia	Ensaio cinético com uréase, GLDH e NADH.	<i>Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.</i>	1,1	15 – 44 mg/dL

* Valores preconizados pela V Diretriz Brasileira de Aterosclerose (XAVIER *et al.*, 2013).

** Equação de Friedewald, LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5.

PCR-us, Proteína C Reativa ultra-sensível

CVa, coeficiente de variação analítico interensaio.

O IMC entre 18,5 a 24,99 kg/m² é considerado normal (eutrófico). É considerado sobrepeso quando os valores encontrarem-se entre 25 e 29,99 kg/m²; obesidade classe I, se estiverem entre 30 e 34,99 kg/m²; obesidade classe II, entre 35 e 39,99 kg/m²; e obesidade classe III quando for $\geq 40,00$ kg/m². Este foi o critério utilizado neste trabalho (WHO, 2000).

O colesterol da fração LDL foi calculado pela equação de Friedewald, onde o LDL-C = Colesterol total – HDL-C – TG/5 (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). E, para a definição de tabagismo, foi adotado o critério da Organização Mundial de Saúde, que considera fumante àquele que fumou mais de 100 cigarros na vida e fuma atualmente; ex-fumante quem fumou mais de 100 cigarros na vida e deixou de fumar há pelo menos um dia; e não fumantes são os que nunca fumaram, os que só experimentaram e os que fumaram menos de 100 cigarros na vida (WHO, 2009).

Para a definição de hipertensão, foram adotados os critérios preconizados pela V Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2007), sendo considerada hipertensão quando a pressão sistólica do participante estava maior ou igual a 140mmHg e a diastólica maior ou igual a 90mmHg; ou, ainda, quando o participante estava em uso de agentes hipertensivos.

A história familiar de diabetes, doenças da tireóide e obesidade foram caracterizadas pela presença de pelo menos um dos pais ou um irmão apresentando a patologia. A dislipidemia foi caracterizada pelo uso de hipolipemiantes.

A história familiar positiva para a DAC foi definida como a presença do evento coronariano no pai antes dos 55 anos de idade e na mãe antes dos 65 anos de idade (SPOSITO *et al.*, 2007).

4.5 ENZIMAIMUNOENSAIO (ELISA) PARA sRAGE E esRAGE

O ensaio de imunoabsorção ligado a enzima ou ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) do tipo sanduíche foi utilizado para a quantificação de sRAGE e esRAGE em um subgrupo de pacientes com DM2 que apresentavam complicações vasculares e controles saudáveis pareados pelo gênero e idade.

A concentração de RAGE solúvel (sRAGE) total foi quantificada por ELISA utilizando reagentes, calibradores e controles comerciais (Quantikine Immunoassay,

R&D Systems, Cat nº DRG00, Minneapolis, MN, USA). A concentração de esRAGE foi quantificada por ELISA utilizando reagentes, calibradores e controles comerciais (esRAGE ELISA KIT, B-Bridge International Inc., Mountain View, CA, USA). Para cada ensaio, foram utilizados 50µL de soro e o procedimento foi realizado conforme orientações contidas nos protocolos dos Kits. A leitura das placas foi realizada no equipamento GloMax®-Multi+ (Promega Biotechnologica do Brasil, Ltda).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos grupos em estudo a normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre variáveis contínuas com distribuição normal foram realizadas pelo teste “t” de Student para amostras independentes ou pela análise de variância (ANOVA) quando pertinente. Variáveis com distribuição normal são descritas como média \pm 1-desvio padrão.

Variáveis sem distribuição normal foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica). As variáveis são apresentadas como mediana (intervalo interquartil, 25%-75%).

Para as análises de correlação linear (Pearson) e nos estudos de associação de variáveis genéticas com os parâmetros laboratoriais e dados clínicos das pacientes, são apresentados o coeficiente de correlação (r) e a probabilidade da análise ou análise de variância (ANOVA), neste caso tendo os polimorfismos como variável classificadora.

Para comparação das variáveis discretas foram utilizados os testes de Qui-quadrado (χ^2) ou o teste Exato de Fisher bidirecional conforme apropriado, bem como tabelas de contingência disponíveis em <http://turner.faculty.swau.edu/mathematics/math241/materials/contablecalc/entry.php>

Para a obtenção e cálculos das comparações envolvendo frequências alélicas e genótípicas, incluído as análises do intervalo de confiança de 95% (95%IC) e equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, foi utilizado o programa DeFinetti, disponível em <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

Para as comparações entre as frequências alélicas observadas no estudo com outros trabalhos publicados, foram considerados resultados similares quando a frequência do alelo raro observada se enquadrava dentro dos limites do intervalo de confiança de 95% (95% IC). Frequências fora desta faixa foram consideradas

diferentes. O programa Statistica para Windows 10.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK) foi utilizado para as análises estatísticas.

Uma probabilidade (P) inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

4.7 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O fluxograma de trabalho está ilustrado na Figura 15.

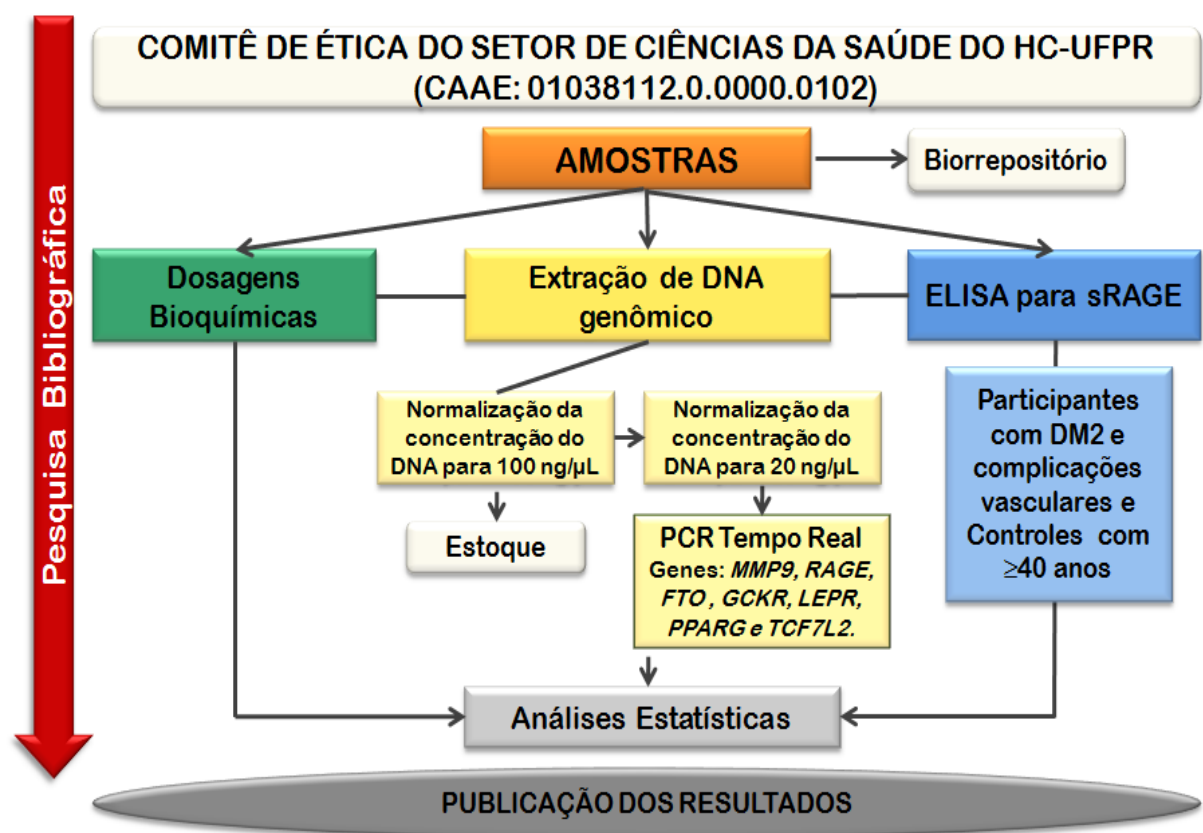


Figura 15 – Fluxograma de trabalho.

Depois de coletadas e processadas as amostras, foram realizadas dosagens bioquímicas, análises genéticas e ELISA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados em quatro tópicos: 1) Caracterização da amostra; 2) Análises bioquímicas; 3) Análises moleculares; e, 4) Isoformas solúveis de RAGE.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra em estudo foi dividida em três grandes grupos caso-controle (DM1, DM2 e DMG), conforme ilustrado na Figura 14. As análises estatísticas descritivas estão reportadas nas Tabelas 5, 6 e 7.

TABELA 5 – CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DOS GRUPOS DM1 E CONTROLES

Parâmetros	Controle (n=117)	DM1 (n=100)	P
Sexo (H/M)	59/58	50/50	0,950*
Idade (anos)	26,8 ± 5,5	34,7 ± 13,6	<0,001
Peso (kg)	72,8 ± 14,1	69,8 ± 17,3	0,161
Altura (m)	1,69 ± 0,9	1,65 ± 0,9	<0,001
IMC (kg/m ²)	25,3 ± 4,2	25,6 ± 5,5	0,697
Etnia (%)			
Euro-Brasileiros	ND	69	-
Afro-Brasileiros		25	
Índios		6	
Hipertensão arterial (%)	ND	43	-
Tabagismo (%)			
Não fumante	ND	75	-
Ex-fumante		19	
Fumante		6	
Dislipidemia (%)	ND	37	-
Histórico familiar de DAC (%)	ND	44	-
Histórico familiar de DM (%)	ND	61	-
Uso de Insulina (%)	ND	100	-
Complicações do DM (%)			
Retinopatia		13	
Infarto Agudo do Miocárdio	ND	10	-
Nefropatia		8	
Neuropatia		5	

H: Homens, M: Mulheres. IMC: Índice de massa corpórea. Probabilidade (P), teste t-Student amostras não pareadas, *Teste do Chi-quadrado. ND: Dado não disponível.

TABELA 6 – CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DOS GRUPOS DM2 E CONTROLES

Parâmetros	Controle (n=298)	DM2 (n=200)	P
Sexo (H/M)	147/151	100/100	0,883*
Idade (anos)	47,1 ± 6,5	61,9 ± 10,3	<0,001
Peso (kg)	75,4 ± 12,9	82,2 ± 16,2	<0,001
Altura (m)	1,68 ± 8,8	1,64 ± 0,9	<0,001
IMC (kg/m ²)	26,8 ± 3,8	30,5 ± 5,5	<0,001
Etnia (%)			
Euro-Brasileiros		63,5	
Afro-Brasileiros	ND	25,5	-
Índios		10	
Orientais		1	
Hipertensão arterial (%)	ND	82	-
Tabagismo (%)			
Não fumante		51	
Ex-fumante	ND	41	-
Fumante		8	
Dislipidemia (%)	ND	80,5	-
Histórico familiar de DAC (%)	ND	50	-
Histórico familiar de DM (%)	ND	56	-
Uso de Insulina (%)	ND	58	-
Complicações do DM (%)			
Retinopatia		27	
Infarto Agudo do Miocárdio	ND	11,5	-
Nefropatia		8,5	
Neuropatia		9	

H: Homens, M: Mulheres. IMC: Índice de massa corpórea. Probabilidade (P), teste t-Student amostras não pareadas, *Teste do Chi-quadrado. ND: Dado não disponível.

TABELA 7 – CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA DOS GRUPOS DMG E CONTROLES

Parâmetros	Controles (n=125)	DMG (n=127)	P
Idade (anos)	30,6 ± 4,7	31,9 ± 6,4	0,070
Semana de gestação ao diagnóstico	18 (12 – 28)	31 (28 – 34)	<0,001*
Peso (kg)	69,9 ± 14,4	83,6 ± 17,2	<0,001
Altura (m)	1,61 ± 0,06	1,59 ± 0,07	0,104
IMC (kg/m ²)	26,9 ± 5,0	32,7 ± 6,3	<0,001
Hipertensão arterial (%)	4,8	14,9	0,007**
Etnia (%)			
Euro-Brasileiras	ND	87,4	-
Afro-Brasileiras		6,3	
Outras		6,3	
Tabagismo (%)			
Não fumante	ND	59,3	-
Ex-fumante		34,2	
Fumante		6,5	
Histórico familiar de DAC (%)	ND	65,4	-
Histórico familiar de DM (%)	ND	70,1	-
Uso de insulina (%)	ND	33,1	-

Variáveis sem distribuição normal: mediana e intervalo interquartil (25%-75%). ND: Dados não disponíveis. IMC: Índice de massa corpórea. Probabilidade (P), Teste t-Student (para variáveis independentes; variáveis com distribuição normal), *Teste de Mann-Whitney (variáveis sem distribuição normal) ou **Teste do Chi-quadrado.

Sexo, Idade e Etnia

Os grupos DM1 e DM2 foram pareados por sexo, e o grupo controle para DMG foi pareado pela idade. Os pacientes com DM1 são significativamente ($P < 0,001$) mais velhos que seus controles saudáveis (Tabela 5). Este fato era esperado, uma vez que os doadores do Banco de Sangue do HC-UFPR (grupo controle) são, em sua maioria, adultos jovens com idade entre 18 e 40 anos.

Neste estudo, a idade média do grupo DM1 foi de aproximadamente 35 anos, e 57% do pacientes tinham diagnóstico há mais de 15 anos (dados não mostrados). O DM1 tem maior incidência na adolescência, porém um aumento da incidência em crianças com menos de 5 anos tem sido observado, possivelmente pela influência de fatores ambientais como deficiência de vitamina D, vírus e ingestão de proteínas do leite de vaca (CHOWDHURY, 2015; SIMMONS; MICHELS, 2015).

A média de idade do grupo DM2, neste estudo, foi de aproximadamente 62 anos. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. O risco para DM2 aumenta com a idade, independente do sexo e da etnia (QIAO *et al.*, 2003). No entanto, a prevalência de DM2 entre jovens e

adolescentes tem crescido, sobretudo pelo desenvolvimento sócio-econômico e hábitos alimentares. Estes jovens são, geralmente, de minorias étnicas como afro-americanos, mexicano-americanos e indígenas (PINHAS-HAMIEL; ZEITLER, 2007; SBD, 2015).

Neste estudo não foi possível comparar a etnia entre os grupos, porque esta informação não estava disponível entre os participantes dos grupos controle. Entre os grupos com diabetes (DM1, DM2 e DMG) a prevalência foi superior a 60% para euro-brasileiros, conforme esperado pelas características da população do Sul do Brasil, onde a amostra foi obtida.

Um estudo conduzido com pessoas de várias etnias vivendo no mesmo meio ocidentalizado avaliou se o estilo de vida, as condições sócio-demográficas e fatores metabólicos justificariam as diferentes prevalências de DM entre grupos étnicos distintos (KANAYA *et al.*, 2014). Em ordem decrescente, a prevalência de DM2 foi maior em asiáticos americanos (23%), que afro-americanos (18%), latino-americanos (17%), chineses americanos (13%) e americanos brancos (6%). Os autores acreditam que não sejam os fatores de risco tradicionais (como obesidade, hipertensão e dislipidemias) os responsáveis pela diferente prevalência, e sim alguma disfunção nas células beta pancreáticas característica dos asiáticos que os tornam mais predispostos ao DM (KANAYA *et al.*, 2014). Outro estudo avaliou o risco para DM2 entre imigrantes de várias etnias que moravam no Canadá e mostrou uma prevalência de DM maior entre imigrantes do sul da Ásia, América Latina e Caribe e África Sub-saariana, semelhante ao estudo anteriormente citado (CREATORE *et al.*, 2010).

Embora o fator étnico seja relevante para estudos genéticos, no presente estudo os grupos controle possivelmente apresentam uma distribuição étnica similar aos grupos com DM, visto que todos os participantes são provenientes da mesma região demográfica.

Índice de Massa Corpórea (IMC)

O IMC não foi diferente entre os pacientes com DM1 e seus controles (Tabela 6), mas as médias de ambos os grupos foi ligeiramente superior ao limite máximo de normalidade (25,3 kg/m² para controles e 25,6 kg/m² para DM1). Pacientes com DM1 costumavam apresentar IMC normal ou reduzido, mas o fenótipo desses pacientes tem mudado nos últimos anos (CONWAY *et al.*, 2010). Esta tendência

pode ser resultado do efeito da insulinoterapia, um hormônio anabolizante, ou do aumento na ingestão calórica para evitar quadros de hipoglicemia.

Comparativamente, os grupos DM2 e os controles saudáveis apresentaram médias de IMC significativamente diferentes ($P < 0,001$; Tabela 6). A média do grupo DM2 foi de $30,5 \text{ kg/m}^2$, compatível com a classe I de obesidade proposta pela OMS; enquanto que a média do grupo controle ($26,8 \text{ kg/m}^2$) indica sobrepeso (WHO, 2000). A obesidade é um dos principais fatores de risco para o DM2, e quanto maior o IMC, maior o risco em desenvolver a doença (LOGUE; WILD; SATTAR, 2014).

Em gestantes com DMG, a resistência à insulina induz uma liberação compensatória de insulina pelo pâncreas, o que pode aumentar o ganho de peso. Quanto maior o IMC da gestante, maior o risco para desenvolver DMG (CHU *et al.*, 2007). Essa informação é compatível com os dados encontrados neste estudo, onde as médias de IMC das gestantes saudáveis e daquelas com DMG apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$; Tabela 7). Gestantes obesas têm maior chance de terem recém-nascidos com tamanho maior que o esperado e necessitarem passar por cesariana (MARTIN *et al.*, 2015).

Hipertensão arterial (HAS)

Inquéritos populacionais apontam para uma prevalência de hipertensão arterial (HAS) superior a 30% no Brasil. A HAS e o DM são condições frequentemente associadas, já que pacientes com DM tem maior risco para desenvolver HAS (SBC, 2007).

Doadores de sangue com HAS foram excluídos do estudo, logo não há como comparar grupos controle com o DM1 e DM2. Mas podemos perceber a alta frequência de HAS entre os grupos DM (43% DM1 e 82% DM2; Tabelas 5 e 6).

No DM1, a hipertensão precede em cerca de 3 anos às complicações microvasculares, como a nefropatia. Quanto aos pacientes com DM2, a maioria já se encontra hipertensa no momento do diagnóstico (SBD, 2015).

Assim como o DM, a HAS tem impacto significativo no desenvolvimento de complicações vasculares, e ambas as condições compartilham mecanismos comuns de lesão endotelial (LONG; DAGOGO-JACK, 2011). No grupo DM1, 29% apresentam pelo menos uma complicação vascular; e, no grupo DM2, 40% apresentam ao menos uma complicação vascular (Tabelas 5 e 6).

Em pacientes hipertensos, a presença de DM é um fator de risco adicional para o infarto agudo do miocárdio (IAM). A HAS é um achado frequente em pacientes com IAM, e quando associada a outras comorbidades vasculares e fatores como o DM, idade avançada, e tabagismo, compõe um perfil de risco mais grave que o perfil de pacientes infartados normotensos (PEDRINELLI *et al.*, 2012). Em um estudo que avaliou a prevalência de comorbidades entre pacientes hospitalizados em decorrência de IAM, a combinação de fatores de risco para DAC mais comum entre os infartados foi a de HAS e DM (CHEN *et al.*, 2013). No presente estudo, 10% dos DM1 já sofreram IAM, assim como 11,5% dos DM2 (Tabelas 5 e 6).

A frequência de HAS em gestantes com DMG foi diferente e superior à das gestantes saudáveis (14,9% vs 4,8%, respectivamente, $P=0,007$). Este valor é superior ao relatado na literatura para o DMG, que é de 5 a 10% (WALKER, 2000).

Tabagismo

O consumo de tabaco está associado ao risco aumentado para DM, e este risco aumenta proporcionalmente com a quantidade de cigarros fumados (WILLI *et al.*, 2007). Inclusive, o risco está presente também em fumantes passivos, já que a fumaça inalada contém vários componentes que ativam processos inflamatórios, causando disfunção endotelial (EZE *et al.*, 2014).

A informação sobre o consumo de tabaco, pelos grupos controles saudáveis, não estava disponível. A frequência de ex-fumantes e fumantes nos grupos DM1, DM2 e DMG, foi 25%, 49% e 40,7%, respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7).

Tem sido relatado que gestantes tabagistas têm risco reduzido para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, um quadro agudo de hipertensão arterial com insuficiência renal, que ocorre durante a gestação. Este efeito protetor do tabaco pode ser atribuído à nicotina, que apresenta efeito antioxidante e inibidor da produção de citocinas, inibindo o desenvolvimento da pré-eclâmpsia; e ao monóxido de carbono, produto da queima do cigarro, que age inibindo a produção placentária de proteínas anti-angiogênicas (WIKSTROM; STEPHANSSON; CNATTINGIUS, 2010).

O possível efeito benéfico do tabaco na gestação é contraposto pelo seu efeito nocivo. Fumar durante a gestação pode levar a um comprometimento do crescimento fetal, com a diminuição do tamanho do feto, ruptura da placenta e parto prematuro (WARD; LEWIS; COLEMAN, 2007; REYNOLDS *et al.*, 2010; LEE *et al.*,

2015). Apesar dos riscos, 6,5% das mulheres com DMG deste estudo continuaram a fumar durante a gestação (Tabela 7).

Dislipidemia

A dislipidemia é uma alteração frequente entre indivíduos com DM, e é causada, em parte, pelo aumento do fluxo de ácidos graxos secundário à resistência à insulina e pelo aumento de adipocinas inflamatórias (CHEHADE; GLADYSZ; MOORADIAN, 2013). Neste estudo, 37% do grupo DM1 e 80,5% do DM2 apresentam dislipidemia (Tabelas 5 e 6). Este tópico será discutido juntamente com a análise do perfil lipídico no subitem 5.2.

Histórico familiar de DM e DAC

A história familiar de DM tem grande influência sobre risco para o desenvolvimento do DM, e o risco aumenta em pacientes com histórico biparental, e cujos diagnósticos foram em idades mais jovens (SCOTT, R. A. *et al.*, 2013). No presente estudo, o histórico familiar de DM foi positivo para 61% dos pacientes com DM1, e 56% dos pacientes com DM2 (Tabelas 5 e 6). Estes dados não estão disponíveis para os grupos controle.

O histórico familiar de DAC é um fator de risco independente para IAM (RANTHE *et al.*, 2015). Neste estudo, aproximadamente 50% dos pacientes com diabetes (DM1 e DM2) apresentaram histórico familiar para DAC, indicando o alto risco de desenvolver complicações macrovasculares como o IAM. Este dado é reforçado pela frequência de 10% de IAM entre os DM1, e 11,5%, entre os pacientes com DM2. No grupo DMG, 65% apresentou histórico familiar de DAC.

Aproximadamente 70% das gestantes com DMG apresentaram histórico familiar de DM (Tabela 7). Comparadas com gestantes sem histórico familiar de DM, as gestantes com histórico positivo têm maior risco para desenvolver DMG, e de partos com crianças macrossômicas (com mais de 4kg ao nascimento), necessitando de cesariana (LEVY *et al.*, 2010).

Uso de hipoglicemiante orais e insulino terapia

Pelo caráter crônico do DM, a maioria dos pacientes não consegue manter um bom controle glicêmico apenas com dieta controlada e exercícios físicos, necessitando de terapia medicamentosa (HAAK, 2015).

Neste estudo, 100% do grupo DM1 faz uso de insulina (Tabela 5). Em pacientes com DM1, a administração deste hormônio é a essência do tratamento, e os regimes de insulinoaterapia variam substancialmente conforme a resposta do paciente à dieta, exercícios, estresse e capacidade residual da produção do hormônio (WANGNOO, 2015).

O tratamento com hipoglicemiantes orais é a primeira escolha para pacientes com DM2, mas, com o tempo, ocorre a deterioração das células beta que pode levar a necessidade do uso de insulina exógena associada às drogas orais (SBD, 2015). Em nosso estudo 58% dos pacientes com DM2 recebem insulina exógena, indicando pacientes afetados a longo tempo com a patologia, e com controle glicêmico inadequado (Tabela 6).

A terapia nutricional é a primeira opção de tratamento para a maioria das gestantes com DMG, porque evita o ganho excessivo de peso pelas gestantes, além de gerar menor frequência de macrossomia fetal e de complicações perinatais, comuns quando em uso de insulina. As diretrizes nacionais e internacionais variam quanto ao tratamento farmacológico, sendo a insulina, a metformina e a glibenclamida as opções terapêuticas (BALSELLS *et al.*, 2015). A SBD sugere o uso de insulina como tratamento padrão (SBD, 2015). A insulinoaterapia foi implementada em 33,1% das gestantes com glicemia inadequada, nas quais a dieta não foi eficaz (Tabela 7).

5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As Tabelas 8, 9 e 10 mostram os resultados encontrados para os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo.

TABELA 8 – CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS DM1 E CONTROLES

Parâmetros	Controles (n=117)	DM1 (n=100)	P
Glicemia (mg/dL)	91,4 ± 18,5	190,8 ± 108,8	<0,001
HbA1c (%)	5,3 ± 0,2	9,0 ± 2,3	<0,001
1,5 anidroglicitol (µg/mL)	28,0 (22,5 – 32,1)	3,8 (2,8 – 5,9)	<0,001*
Colesterol total (mg/dL)	156,6 ± 35,7	169,3 ± 37,3	<0,001
HDL-Colesterol (mg/dL)	51,5 ± 12,7	46,0 ± 13,2	0,180
LDL-Colesterol (mg/dL)	83,8 ± 28,8	100,6 ± 29,7	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	97,0 (66 – 130)	81,5 (63 – 114,5)	<0,001*
Albumina (g/dL)	3,9 ± 0,2	4,1 ± 0,4	<0,001
Proteína Total (g/dL)	7,1 ± 0,4	7,6 ± 0,7	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,62 (0,49 – 0,74)	0,86 (0,80 – 1,0)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	23,0 (20 – 28)	29,0 (24 – 39)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	4,8 ± 1,2	3,6 ± 1,2	<0,001
PCR-us (mg/dL)	1,43 (0,59 – 3,01)	2,1 (0,9 – 4,5)	0,007*

Os resultados para as variáveis são apresentados como: Média±1-DP ou Mediana (intervalo interquartil, 25%-75%). Probabilidade (P), Teste t-Student para variáveis independentes ou *Mann-Whitney. LDL-C: Obtido pela equação de Friedewald. PCR-us: proteína C reativa ultrassensível.

TABELA 9 – CONCENTRAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS DM2 E SEUS CONTROLES

Parâmetros	Controles (n=298)	DM2 (n=200)	P
Glicemia (mg/dL)	91,0 (79 – 104)	130,0 (105 – 173,5)	<0,001*
HbA1c (%)	5,3 (5,1 – 5,4)	7,5 (6,3 – 8,8)	<0,001*
1,5 anidroglicitol (µg/mL)	25,2 (20,4 – 30,5)	10,6 (5,7 – 20,9)	<0,001*
Colesterol total (mg/dL)	184,5 (163 – 209)	170,0 (146 – 194,5)	<0,001*
HDL-Colesterol (mg/dL)	54,0 (46 – 63)	40,0 (34 – 47)	0,771*
LDL-Colesterol (mg/dL)	98,7 (82,4 – 121,2)	101,2 (78,9 – 123,5)	<0,001*
Triglicérides (mg/dL)	130,5 (88 – 178)	123,0 (93 – 187,5)	0,678*
Albumina (g/dL)	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,4	<0,001
Proteína Total (g/dL)	6,9 ± 0,4	7,7 ± 0,6	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,64 (0,51 – 0,77)	0,9 (0,8 – 1,1)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	25,0 (22 – 32)	37,5 (30 – 46)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	4,4 ± 1,2	4,9 ± 1,4	<0,001
PCR-us (mg/dL)	1,84 (0,93 – 3,02)	2,8 (1,7 – 6,2)	<0,001*

Os resultados para as variáveis são apresentados como: Média±1-DP ou Mediana (intervalo interquartil, 25%-75%). Probabilidade (P), Teste t-Student para variáveis independentes ou *Mann-Whitney. LDL-C: Obtido pela equação de Friedewald. PCR-us: proteína C reativa ultrassensível.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÕES E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA DMG E GESTANTES SAUDÁVEIS

Parâmetros	Controles (n=125)	DMG (n=127)	P
Glicemia em jejum (mg/dL)	84,0 (79 – 88)	88 (81 – 95)	<0,001*
Glicemia 2h-75g	ND	161,0 (149 – 176)	-
HbA1c (%)	ND	5,6 (5,3 – 5,9)	-
1,5 anidroglicitol (µg/mL)	11,7 ± 6,9	9,8 ± 5,1	0,060
Colesterol total (mg/dL)	213,9 ± 50,0	224,7 ± 45,6	0,074
HDL-Colesterol (mg/dL)	55,4 ± 15,8	56,8 ± 12,5	0,451
LDL-Colesterol (mg/dL)	130,9 ± 41,5	123,5 ± 38,9	0,146
Triglicérides (mg/dL)	124,0 (96 – 171)	221,0 (175 – 270)	<0,001*
Albumina (g/dL)	4,2 ± 0,6	3,4 ± 0,4	<0,001
Proteína Total (g/dL)	6,9 ± 0,8	6,4 ± 0,5	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,80 (0,7 – 0,9)	0,70 (0,60 – 0,72)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	20,4 ± 5,3	16,1 ± 4,8	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	3,6 (3,0 – 3,9)	4,3 (3,7 – 4,9)	<0,001*

Os resultados para as variáveis são apresentados como: Média±1-DP ou Mediana (intervalo interquartil, 25%-75%). Probabilidade (P), Teste t-Student para variáveis independentes ou *Mann-Whitney. LDL-C: Obtido pela equação de Friedewald.

Glicemia

O grupo controle, utilizado para comparações com os grupos DM1 e DM2, é formado por doadores de sangue saudáveis (conforme descrito no item 4.1). Estes indivíduos são orientados e estimulados a se alimentarem antes da coleta para doação de sangue. Logo, as concentrações de glicemia dos grupos controle reportados nas Tabelas 9 e 10 foram obtidas na ausência de jejum. As amostras dos grupos com diabetes (DM1 e DM2) foram coletadas após jejum de 12 horas. Apesar disso, as concentrações da glicemia para os grupos DM1 e DM2 foram significativamente maiores ($P<0,001$) quando comparados aos seus controles saudáveis (Tabelas 8 e 9), o que mostra a consistência da classificação da amostra (saudáveis vs. doentes). Em relação às gestantes, a glicemia estratifica os grupos (Tabela 10), sendo mais elevada nas gestantes com DMG.

Hemoglobina glicada (HbA1c)

A HbA1c é um marcador utilizado para o diagnóstico de DM e para o monitoramento do paciente. Neste estudo, as concentrações de HbA1c foram maiores para os grupos DM1 e DM2 quando comparado aos seus controles ($P < 0,001$), conforme descrito nas Tabelas 8 e 9.

Esta informação confirma a classificação da amostra e demonstra o mau controle glicêmico dos pacientes DM1 e DM2 avaliados neste estudo. Dados similares foram relatados no estudo realizado por Viana e colaboradores (2013), onde pacientes brasileiros com DM2 atendidos pelo SUS apresentaram controle glicêmico inadequado.

Apesar da meta terapêutica recomendada pela ADA (2015) e ratificada pela SBD (2015) ser de uma HbA1c menor que 7%, alguns pesquisadores têm mostrado que pacientes com DM1, mesmo dentro da meta ($HbA1c \leq 6,9\%$), apresentam altas taxas de mortalidade em decorrência das complicações do DM (LIND; SVENSSON; ROSENGREN, 2015). Este fato aponta para o alto risco em que os pacientes deste estudo se encontram, já que tanto as médias de HbA1c para DM1 (9,0%) quanto para DM2 (7,5%) estão acima da meta recomendada para bom controle glicêmico (Tabela 8 e 9).

Além do benefício ao paciente, a redução das concentrações de HbA1c gera uma considerável economia para os sistemas de saúde. Na Itália, pacientes com DM consomem mais de 6% do orçamento anual do sistema de saúde daquele país. Em estudo conduzido com italianos com DM1, foi relatado que a redução em 1% no valor da HbA1c reduz significativamente os custos com as complicações vasculares do DM. Em 5 anos, essa economia poderia chegar a 30 milhões de euros (NICOLUCCI; BUSEGHIN; DE PORTU, 2015).

Na gestação, o controle glicêmico parece ser mais adequado quando monitorado através das concentrações de glicemia em jejum do que pela HbA1c, devido ao longo período necessário para que as concentrações glicêmicas alteradas possam ser capturadas pela HbA1c. Para diagnóstico de DMG o padrão-ouro ainda é o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O uso da HbA1c para triagem e monitoramento do DMG é controverso (YU; QI; WANG 2014), mas este biomarcador tem sido proposto como preditor de anormalidades glicêmicas e DM pós-parto em mulheres com DMG (KATON *et al.*, 2012; GRANADA *et al.*, 2014). No presente estudo, as concentrações de HbA1c não estavam disponíveis para o grupo de

gestantes saudáveis e, as gestantes com DMG apresentaram bom controle glicêmico (HbA1c 5,6%; Tabela 10).

1,5 anidroglucitol

O 1,5 anidroglucitol (1,5AG) é um poliol de origem natural, presente na dieta: em cereais, carne de porco e gado e em grãos de soja (YAMANOUCHI *et al.*, 1992). Nos rins, ele é filtrado e praticamente todo reabsorvido (99,9%) nos túbulos. Em condições fisiológicas e normoglicêmicas sua concentração plasmática se mantém constante (YAMANOUCHI *et al.*, 1989).

Em processos hiperglicêmicos, onde a glicemia ultrapassa o limiar renal (~180mg/dL), ocorre uma competição entre o 1,5AG e a glicose pela reabsorção tubular proximal, sendo a reabsorção da glicose favorecida. Dessa forma, à medida que ocorre aumento da glicemia plasmática, a reabsorção do 1,5AG diminui, levando à redução da sua concentração plasmática (DUNGAN, 2008).

O 1,5AG reflete elevações transitórias da glicose em 24 a 72 horas (YAMANOUCHI *et al.*, 1992); logo, a determinação plasmática do 1,5 AG permite a análises do controle glicêmico de curto prazo, como a hiperglicemia pós-prandial, quando comparado à HbA1c, que reflete a glicemia de médio prazo, ou 120 dias (JANUSZEWSKI *et al.*, 2012).

As concentrações médias de 1,5AG ($\mu\text{g/mL}$) encontradas para DM1 foram cerca de 7 vezes menores quando comparadas a controles saudáveis (3,8 vs 28; $P<0,001$, respectivamente), indicando que os pacientes com DM1 presentes em nosso estudo estão sujeitos a picos hiperglicêmicos (Tabela 8). Valores reduzidos de 1,5AG estão relacionados com a hiperglicemia pós-prandial mesmo em indivíduos com DM bem controlado (HbA1c entre 6–8%), tornando-o um bom marcador da hiperglicemia pós-prandial (WON *et al.*, 2009). O uso de 1,5AG para indicar picos de hipoglicemia parece ser bastante útil como biomarcador em indivíduos com DM1, nos quais é mais comum a ocorrência de hipoglicemia severa pelo uso de insulina (GREVEN *et al.*, 2010).

Os pacientes com DM2 apresentaram concentrações de 1,5AG ($\mu\text{g/mL}$) aproximadamente 2,5 vezes menores que as de seus controles (10,6 vs 25,2, respectivamente; $P<0,001$), como mostrado na Tabela 9. A hipótese que tem sido apresentada é que em pacientes com DM mal controlado, as concentrações de 1,5AG reduzem substancialmente, levando cerca de cinco semanas para se

restabelecer, e esta característica do 1,5AG tornaria este biomarcador impreciso para estratificar adequadamente o controle glicêmico de médio prazo (SEOK *et al.*, 2015).

Já está bem estabelecido que a variabilidade glicêmica (“picos” ou “marés glicêmicas” de hipo- e hiperglicemia) é mais prejudicial que a própria hiperglicemia crônica, sendo um fator de risco independente para as complicações vasculares do DM (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2000). A variabilidade glicêmica aumenta o estresse oxidativo e a inflamação, ambos importantes mediadores do dano endotelial, como já descrito anteriormente (SMITH-PALMER *et al.*, 2014).

Na gestação, as concentrações de 1,5AG diminuem significativamente, mesmo em mulheres saudáveis, provavelmente pelo aumento da filtração glomerular, pela glicosúria associada à gestação e pelo efeito dilucional (hemodiluição) decorrente do aumento do volume plasmático que ocorre neste período (PICCOLI *et al.*, 2015). Em um estudo prévio conduzido por nosso grupo, foi demonstrado que gestantes com DMG apresentaram concentrações de 1,5AG menores que de gestantes saudáveis, e ainda, com menor variação durante o período gestacional. As concentrações de 1,5AG permitiram discriminar DMG de gestantes saudáveis no início da gestação (13-23 semanas) com boa sensibilidade e especificidade (BORITZA *et al.*, 2014). No presente estudo, os valores de 1,5AG ($\mu\text{g/mL}$) das gestantes com DMG foram menores que os das gestantes saudáveis (9,8 vs 11,7; $P=0,060$).

As concentrações de 1,5AG são diferentes entre os tipos de diabetes, sendo maiores em mulheres com DMG do que naquelas com DM1, e este fato foi confirmado neste trabalho (dados não mostrados). Concentrações baixas de 1,5AG ($<10 \mu\text{g/mL}$) estão associadas com maior peso do recém-nascido, podendo ser útil para acessar o controle glicêmico durante a gestação, juntamente com a HbA1c (DELANEY; COLEY; BROWN, 2015).

Perfil lipídico

O perfil lipídico compreende a quantificação sérica do colesterol total, HDL-c (HDL-colesterol), LDL-c (LDL-colesterol) e triglicérides. As médias do HDL-c para todos os grupos estudados estavam abaixo da concentração associada à proteção cardiovascular ($>60 \text{ mg/dL}$) recomendada pela V Diretriz Brasileira em Dislipidemia (XAVIER *et al.*, 2013).

A ausência de jejum nos grupos controle pode ter afetado positivamente as concentrações de triglicérides, cuja dosagem necessita de jejum mínimo de 12 horas. De fato, em nosso estudo as médias de triglicérides dos grupos DM1 e DM2 foram menores ($P < 0,001$) que seus respectivos controles (Tabelas 8 e 9). Além da ausência de jejum nos controles, temos como hipótese que os pacientes dos grupos DM1 e DM2 estão submetidos à intensa terapia hipolipemiante, sendo este o fator determinante pelo nosso achado.

No grupo DM1 e DM2 e seus respectivos controles, as concentrações de colesterol total e LDL-c, marcadores de risco para doença cardiovascular, foram maiores na presença do DM (Tabelas 8 e 9). O marcador de proteção, HDL-c, não foi diferente entre os grupos, sugerindo que tem baixo poder discriminante no DM.

Alterações no metabolismo dos lipídeos são frequentes nos pacientes com DM. As concentrações observadas em nosso estudo para os pacientes com DM1 e DM2, próximas aos valores desejados para caracterizar risco baixo de doença cardiovascular, podem refletir a intensa terapia hipolipemiante empregada nestes pacientes. As doenças cardiovasculares são as que mais matam no mundo, e, as alterações lipídicas são as principais responsáveis pela aterosclerose, base fisiológica da DAC, Doença Arterial Coronariana (KONES; RUMANA, 2014).

A hiperglicemia crônica do DM é um dos fatores de risco para DAC, já que as vias envolvidas no metabolismo da glicose estão implicadas na disfunção endotelial, etapa crucial para o início da aterosclerose (BORNFELDT; TABAS, 2011). Somado a este fato, o indivíduo portador de DM apresenta em geral um conjunto de anormalidades lipídicas caracterizado por concentrações aumentadas de triglicérides, redução do HDL-c e aumento de LDL-c (KRAUSS, 2004). A maioria dos pacientes com DM, mesmo em tratamento hipolipemiante, apresenta alguma anormalidade lipídica. Concentrações de LDL-c aumentados são as mais frequentes (AL SIFRI *et al.*, 2014). Este quadro favorece o risco de desenvolver aterosclerose, e, conseqüentemente, o IAM (ADA, 2015a). Neste estudo, os valores médios de LDL-c estão acima das concentrações recomendadas (< 70 mg/dL) para os grupos DM1 e DM2 (XAVIER *et al.*, 2013).

O IAM é a maior causa de morte entre os pacientes com DM. Pacientes com DM2 tem de 2 a 4 vezes maior risco de mortalidade cardiovascular que indivíduos não diabéticos, e são menos propensos a sobreviver a um primeiro IAM que indivíduos sem DM2 (HERNANDEZ *et al.*, 2011).

O DM é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares (PLUTZKY, 2011) e a estreita relação entre essas duas patologias é bem estabelecida (CANTO *et al.*, 2011). Alguns mecanismos podem estar envolvidos com a manifestação precoce de aterosclerose em indivíduos com DM, entre eles estão: o efeito tóxico direto da glicose sobre as células endoteliais que não conseguem regular a entrada de glicose (BROWNLEE, 2001); o estresse oxidativo que leva a disfunção endotelial (BROWNLEE, 2005); a redução na produção de óxido nítrico, fator derivado do endotélio que inibe praticamente todas as vias envolvidas na aterosclerose (HAMED; BRENNER; ROGUIN, 2011); e a disfunção de células progenitoras endoteliais (TOUSOULIS; KAMPOLI; STEFANADIS, 2012).

Durante a gestação, alterações no metabolismo lipídico ocorrem para garantir o aporte de nutrientes para o crescimento fetal (MARSEILLE-TREMBLAY *et al.*, 2008). O colesterol é usado pela placenta para a síntese de hormônios esteroides, enquanto os ácidos graxos são oxidados e utilizados para a síntese de membranas celulares (DI CIANNI *et al.*, 2003). De fato, tanto o grupo DMG quanto o grupo de gestantes saudáveis apresentaram concentrações colesterol total e LDL-c acima dos valores desejáveis, sem diferença ($P>0,05$) entre as gestantes com DMG e as saudáveis (Tabela 10). As concentrações de triglicérides em gestantes com DMG foram cerca de duas vezes superiores ($P<0,001$) às das gestantes saudáveis (Tabela 10).

A resistência fisiológica à insulina ocorre em todas as gestações por volta da 24ª a 28ª semana de gestação e progride durante o terceiro trimestre. A alteração do metabolismo de lipídeos da mãe também é comum, com discreto aumento das concentrações lipídicas no início da gestação e um aumento mais significativo no final da gestação, principalmente de triglicérides. Estas alterações são progressivas e em mulheres com DMG podem ser acentuadas; o DMG induz um estado de dislipidemia consistente com a resistência à insulina (RYCKMAN *et al.*, 2015).

A relação entre o meio intrauterino e o desenvolvimento de obesidade, DM e doenças cardiovasculares na fase adulta tem sido amplamente estudada. Distúrbios no crescimento fetal podem ser causados por anormalidades no metabolismo lipídico da mãe durante a gestação. A hiperinsulinemia materna pode favorecer a obesidade do filho na idade adulta, assim como anormalidades lipídicas durante a gestação predispõem o adulto à obesidade e alterações lipídicas (SCHAEFER-GRAF *et al.*, 2008).

Albumina e Proteínas Totais

Apesar dos valores de proteínas totais e albumina serem estatisticamente diferentes entre todos os grupos (DM1, DM2, DMG e seus respectivos controles), as concentrações destes parâmetros se encontram dentro do intervalo de referência, sugerindo bom aporte alimentar entre os participantes (Tabelas 8, 9 e 10). Valores reduzidos de albumina e proteínas totais poderiam sugerir perda, e indicar comprometimento renal (ROSHAN; STANTON, 2013).

Creatinina e Ureia

As concentrações de creatinina e ureia, biomarcadores de filtração glomerular, foram maiores ($P<0,05$) nos grupos DM1 e DM2 quando comparados a seus controles, mas encontram-se dentro do intervalo de referência, sugerindo que a maioria dos pacientes com DM não apresenta lesão renal manifesta (Tabelas 8 e 9). Concentrações de ureia e creatinina maiores nos grupos DM1 e DM2 podem sugerir uma alteração renal discreta, sem manifestações clínicas. Ainda, com o avanço da idade e na presença do DM ocorre uma perda progressiva da função renal (MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014). Mesmo nos pacientes DM1 e DM2 com nefropatia (8 DM1 e 17 DM2, total=25), a creatininemia não ultrapassou 2,0 mg/dL, concentração que raramente está associada à manifestações clínicas.

As concentrações médias de ureia no grupo DMG foram menores às das gestantes saudáveis (Tabela 10). É possível que o aumento no fluxo urinário mais proeminente nas pacientes com DMG, associado ao período gestacional mais avançado neste grupo, possa explicar estes achados (BURTIS *et al.*, 2001).

Também a maior frequência de hipertensão entre as gestantes com DMG (~15%) está associada ao aumento do volume sanguíneo que promove o aumento da filtração glomerular, consequentemente aumentando a depuração de ureia e creatinina, com redução da concentração sérica (LINDHEIMER; TALER; CUNNINGHAM, 2008).

Ácido úrico

O ácido úrico parece desempenhar um importante papel pró-inflamatório por estimular a liberação de moléculas associadas ao processo inflamatório, como a proteína C reativa (PCR), a MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) ou Proteína quimiotática de monócitos-1, a interleucina 6 e o TNF-alfa, conduzindo a

lesão do endotélio vascular (KANELLIS; KANG, 2005; BALDWIN *et al.*, 2011). Ele também aumenta a produção de endotelina 1, que atua inibindo o óxido nítrico e provocando uma vasoconstrição, o que dificulta a passagem sanguínea e pode aumentar a pressão arterial (CHOI, Y. J. *et al.*, 2014).

Apesar de um estudo recente ter demonstrado não haver relação causal entre ácido úrico e risco para desenvolvimento de DM em europeus (SLUIJS *et al.*, 2015), outros estudos associaram altas concentrações plasmáticas de ácido úrico com síndrome metabólica (BONAKDARAN; KHARAQANI, 2014), doenças cardiovasculares (VIAZZI *et al.*, 2014) e doença renal (ATHYROS; MIKHAILIDIS, 2014), comorbidades associadas ao DM. Além disso, a hiperuricemia tem sido associada com as complicações vasculares do DM (KATSIKI *et al.*, 2013). No presente estudo, as concentrações médias de ácido úrico estavam no intervalo de referência para todos os grupos (Tabelas 8, 9 e 10). As concentrações de ácido úrico foram maiores nos controles saudáveis quando comparados àqueles com DM1 e maiores nos DM2 comparados aos seus controles (Tabelas 8 e 9). Estas diferenças entre DM1 e DM2 podem estar relacionadas à função renal, uma vez que este analito é excretado essencialmente pela urina (BURTIS *et al.*, 2001).

O ácido úrico foi apontado como um fator de risco independente para o desenvolvimento de DM2 mais fortemente associado às mulheres (COUTINHO TDE *et al.*, 2007). Também na gestação, o ácido úrico está correlacionado com a resistência à insulina em mulheres com hipertensão gestacional (WEISZ *et al.*, 2005). Interessante observar que a hiperuricemia no primeiro trimestre de gestação, está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de DMG, independente do IMC (LAUGHON *et al.*, 2009). Apesar de estarem no intervalo de referência, as concentrações médias de ácido úrico (mg/dL) foram maiores no grupo DMG quando comparados às gestantes saudáveis (4,3 vs 3,6; $P < 0,001$), e podem estar associados à resistência à insulina e a hipertensão, em concordância com o que foi relatado por outros autores (YOO *et al.*, 2005; LAUGHON; CATOV; ROBERTS, 2009).

PCR ultrasensível

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda, e a metodologia ultrasensível consegue detectar pequenos aumentos no plasma sanguíneo. Este marcador tem sido usado para identificar atividade inflamatória de baixa intensidade

e é um fator de risco independente para mortalidade em pacientes com DM (STEHOUWER *et al.*, 2002).

Além disso, esta proteína tem sido associada com as complicações vasculares do DM, principalmente com o risco de pacientes com DM2 em desenvolver nefropatia diabética (HAYASHINO *et al.*, 2014). Neste estudo, os pacientes DM1 e DM2 apresentaram concentrações significativamente ($P < 0,05$) aumentadas em relação aos controles para DM1 e DM2 (Tabelas 8 e 9). O aumento de cerca de 50% observado nos pacientes com diabetes em relação aos controles pode expressar as alterações vasculares, subclínicas, já presentes e bem caracterizadas nestas patologias.

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

As características da discriminação genotípica obtida por PCR em tempo real através do sistema TaqMan® (equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), estão apresentadas no Anexo 3, tendo como exemplo a genotipagem do polimorfismo rs7901695 do gene *TCF7L2*.

Dados sobre as frequências genotípicas ou do alelo menos comum em outras populações foram obtidas no website HapMap (<http://www.HapMap.org/index.html.en>).

Análises moleculares de DM1 e controles e DM2 e controles

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados nos DM1 e controles e DM2 e controles encontram-se nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

TABELA 11 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs17576 DO GENE *MMP9* E rs3134945 DO GENE *RAGE* PARA OS GRUPOS DM1 E CONTROLES

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Controle n = 117	DM1 n = 100	P
<i>MMP9</i> rs17576 (A>G)	Codominante	AA	50 (42,7)	48 (48,0)	0,469*
		AG	52 (44,5)	44 (44,0)	
		GG	15 (12,8)	8 (8,0)	
		Frequência Alelo G [95% IC]	35,0 [29-41]	30,0 [24-36]	0,264
	Dominante	AA/ AG+GG	50/67	48/52	0,437
	Recessivo	GG/ AG+AA	15/102	8/92	0,250
<i>RAGE</i> rs3134945 (A>C)	Codominante	CC	78 (66,7)	56 (56,0)	0,162*
		CA	37 (31,6)	39 (39,0)	
		AA	2 (1,7)	5 (5,0)	
		Frequência Alelo A [95% IC]	17,5 [13-22]	24,5 [19-30]	0,074
	Dominante	CC/ CA+AA	78/39	56/44	0,107
	Recessivo	AA/ CA+CC	2/115	5/95	0,172

Genótipos descritos em n (%). P, probabilidade, Teste de Chi-quadrado ou *Teste Exato de Fisher bidirecional. 95% IC: Intervalo de confiança de 95%

Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$).

TABELA 12 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs17576 DO GENE *MMP9* E rs3134945 DO GENE *RAGE* PARA OS GRUPOS DM2 E CONTROLES

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Controle n = 298	DM2 n = 200	P
<i>MMP9</i> rs17576 (A>G)	Codominante	AA	137 (46,0)	88 (44,0)	0,269*
		AG	121 (40,6)	93 (46,5)	
		GG	40 (13,4)	19 (9,5)	
		Frequência Alelo G [95% IC]	33,7 [30-38]	32,8 [28-37]	0,749
	Dominante	AA/ AG+GG	137/161	88/112	0,664
	Recessivo	GG/ AG+AA	40/258	19/181	0,184
<i>RAGE</i> rs3134945 (A>C)	Codominante	CC	210 (70,6)	134 (67,0)	0,659*
		CA	81 (27,2)	59 (29,5)	
		AA	7 (2,2)	7 (3,5)	
		Frequência Alelo A [95% IC]	15,9 [13-19]	18,3 [14-22]	0,339
	Dominante	CC/ CA+AA	210/88	134/66	0,411
	Recessivo	AA/ CA+CC	7/291	7/193	0,446

Genótipos descritos em n (%). P, probabilidade, Teste de Chi-quadrado ou *Teste Exato de Fisher bidirecional. 95% IC: Intervalo de confiança de 95%.

Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$).

5.3.1 Polimorfismo rs17576 do gene *MMP9*

A *MMP9* é uma gelatinase que degrada a membrana basal e componentes da matriz extracelular, e está envolvida na clivagem do *RAGE*. O polimorfismo rs17576 do *MMP9* está localizado na região envolvida com o sítio de ligação da enzima *MMP9* com o substrato, alterando a afinidade de ligação, e, conseqüentemente, promovendo acúmulo de proteínas de matriz extracelular que lesam o endotélio (NAZIR *et al.*, 2014).

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas da variante rs17576 do *MMP9* não foram diferentes ($P > 0,05$) entre DM1 e seus controles ou DM2 e seus controles (Tabelas 11 e 12). As frequências genotípicas do polimorfismo estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos (Anexo 4).

Não foram observadas diferenças entre as frequências alélicas ($P = 0,495$) e genotípicas entre os DM1 e DM2 ($P = 0,798$), bem como entre as frequências alélicas

($P=0,718$) e genotípicas dos controles saudáveis ($P=0,773$) para o polimorfismo do gene *MMP9* em estudo (dados não mostrados).

As concentrações séricas de MMP9, enzima que atua na degradação da matriz extracelular, têm sido associadas em pacientes com DM a eventos vasculares e com o tempo da doença (AHLUWALIA *et al.*, 2009; SYMEONIDIS *et al.*, 2013). Como as complicações vasculares são potencializadas na presença do diabetes, polimorfismos, em particular os funcionais (troca de aminoácidos) são alvos de interesse para DM1 e DM2. O genótipo GG do polimorfismo rs17576 do gene MMP9 foi associado a risco aumentado para nefropatia diabética em indianos com DM2 (AHLUWALIA *et al.*, 2009). Entretanto, neste estudo, nenhum dos parâmetros analisados (descritos nas Tabelas 5, 6, 8 e 9) foi associado com o polimorfismo ($P>0,05$).

Não foram encontrados na literatura outros estudos que tenham analisado esta variante em populações com DM1. As comparações das frequências alélicas e genotípicas estão apresentadas na Tabela 13.

TABELA 13 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs17576 DO GENE *MMP9* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			AA	AG	GG	G
Euro-brasileiros (Presente estudo)	DM1	100	48	44	8	30
	Controles	117	42,7	44,5	12,8	35
	DM2	200	44	46,5	9,5	32,8
	Controles	298	46	40,6	13,4	33,7
Chineses (HU <i>et al.</i> , 2005)	Câncer de pulmão	747	48	43,4	8,6	30,3
	Controles	744	46	43,2	10,8	32,5
Alemães (BLANKENBERG <i>et al.</i> , 2003)	DAC	1067	41,7	46,2	12,1	35,2
HapMap-YRI	Africanos	90	35,0	51,7	13,3	36,3
HapMap-CEU	Europeus	180	38,3	48,3	13,4	37,5
Chineses (WANG <i>et al.</i> , 2011)	SCA	361	34,1	42,1	23,8	44,9
	Controles	437	37,1	43,7	19,2	41,4
Ingleses (YASMIN <i>et al.</i> , 2006)	Controles	868	37,9	41	21,1	41,6
Indianos Sul Norte	DM2	92	20	34	46	37,0
	DM com nefropatia	96	41	30	29	55,5
	DM2	255	14,1	38	47,9	33,1
	DM com nefropatia	240	22,9	47,1	30	46,5
(AHLUWALIA <i>et al.</i> , 2009)	Chineses Han	90	13,3	31,1	55,6	67,4
HapMap-HCB						

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (G) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável. SCA, Síndrome Coronariana Aguda. CEU, residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. JPT, japoneses em Tóquio. HCB, chineses Han em Beijing. YRI, africanos yoruba em Ibadan, Nigéria.

As frequências do alelo G nos grupos DM1 e DM2 foram semelhantes às de indianos com DM2, chineses com síndrome coronariana aguda, chineses com câncer de pulmão, indianos com DM2 e alemães com DAC; porém menores que a relatada em indianos com DM e nefropatia (Tabela 13).

A frequência do alelo G encontrada em nossos grupos controle é semelhante àquela descrita em ingleses saudáveis e chineses (HU *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011). A frequência do alelo G ainda foi similar a relatada no HapMap para europeus e africanos.

Em síntese, o polimorfismo rs17576 do gene *MMP9* não foi associado ao DM1 ou DM2 e as frequências do alelo G observadas na população em estudo são similares as de outras populações caucasianas (HapMap-CEU).

5.3.2 Polimorfismo rs3134945 do gene *RAGE*

A ligação RAGE-AGE promove a sinalização de vias pro-inflamatórias e pro-coagulantes, evento chave observado nas complicações vasculares do DM. Apesar da função do polimorfismo rs3134945 não ser conhecida, variantes genéticas no *RAGE* podem afetar a expressão de RAGE e sua afinidade com ligantes. Estes polimorfismos podem também afetar a produção de isoformas solúveis de RAGE (HUDSON *et al.*, 2001).

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas do rs3134945 do gene *RAGE* não foram diferentes ($P>0,05$) entre DM1 e seus controles ou DM2 e seus controles (Tabelas 11 e 12). As frequências genotípicas do polimorfismo analisado estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos (Anexo 4).

Quando comparadas as frequências alélicas ($P=0,073$) e genotípicas ($P=0,175$) entre DM1 e DM2 estas não foram diferentes, bem como não foram observadas diferenças entre os controles saudáveis para as frequências alélicas ($P=0,576$) e genotípicas ($P=0,632$) para o rs3134945 (dados não mostrados).

O polimorfismo estudado não mostrou associação com nenhum parâmetro analisado (Tabelas 5, 6, 8 e 9) nos grupos DM1 e seus controles ou DM2 e seus controles ($P>0,05$). O mesmo foi relatado no estudo conduzido por Gaens e colaboradores (2009), onde a frequência genotípica do polimorfismo rs3134945 do *RAGE* em caucasianos não foi diferente entre controles e DM, e não mostrou associação com as concentrações séricas de AGEs e sRAGE. A funcionalidade do polimorfismo rs3134945 ainda não está comprovada, mas indivíduos com o alelo de maior frequência (alelo C) apresentam maiores concentrações de glicemia em jejum, de glicemia pós sobrecarga e de insulina (GAENS *et al.*, 2009).

Não foram encontrados na literatura outros estudos que tenham analisado esta variante em populações com DM1. As comparações foram feitas entre diferentes populações (Tabela 14). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que

levanta a frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs3134945 do gene *RAGE* em euro-brasileiros com DM1 e DM2.

TABELA 14 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3134945 DO GENE *RAGE* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	N	CC	Genótipo (%)		Alelo (%)
				CA	AA	A
Euro-brasileiros	DM1	100	56,0	39,0	5,0	24,5
	Controles	117	66,7	31,6	1,7	17,5
(Presente estudo)	DM2	200	67,0	29,5	3,5	18,3
	Controles	298	70,6	27,2	2,2	15,9
	Europeus	180	64,6	31,0	4,4	19,9
HapMap-CEU						
Holandeses	Misto	525	61,3	36,6	2,1	20,4
(GAENS <i>et al.</i> , 2009)						
	Japoneses	91	97,7	2,3	0	1,2
HapMap-JPT						
	Chineses Han	90	88,4	11,6	0	5,8
HapMap-HCB						
Holandeses	DM2	133	65,4	35,6	0	17,3
	Controles	284	58,4	38,4	3,2	22,4
(GAENS <i>et al.</i> , 2008)						
	Africanos	90	52,6	40,4	7,0	27,2
HapMap-YRI						

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (A) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável. CEU, residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. HCB, chineses Han em Beijing. JPT, japoneses em Tóquio. YRI, africanos yoruba em Ibadan, Nigéria.

A frequência do alelo A encontrada neste estudo em pacientes com DM1 e DM2 não foi diferente daquela reportada para holandeses. Os nossos grupos controle também apresentaram frequência semelhante àquela encontrada em controles holandeses (GAENS *et al.*, 2008). Entretanto, ao comparar nossos grupos controle DM1 e controles do DM2 com a frequência do A em orientais (HapMap-HCB e JPT), a frequência encontrada em chineses e japoneses foi menor e significativamente diferente da nossa. O alelo A é mais frequente entre africanos que europeus, orientais e a população sul-brasileira deste estudo (Tabela 14).

Este estudo é o primeiro a relatar a frequência alélica e genotípica desta variante em euro-brasileiros com DM1 e DM2. Em suma, o rs3134945 não foi associado ao DM1 ou DM2 em nosso estudo e as frequências alélicas guardam semelhança com outras populações caucasianas.

Análises moleculares de gestantes com DMG e gestantes saudáveis

As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos estudados nas gestantes com DMG encontram-se na Tabela 15.

TABELA 15 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS SNPs ESTUDADOS NO GRUPO DMG E GESTANTES SAUDÁVEIS

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Controle n = 125	DMG n = 127	P
<i>FTO</i> rs1421085 (C>T)	Codominante	TT	53 (42,4)	52 (40,9)	0,420*
		TC	52 (41,6)	61 (48,0)	
		CC	20 (16,0)	14 (11,1)	
		Frequência Alelo C [95% IC]	36,8 [31-43]	35,0 [29-41]	0,680
<i>GCKR</i> rs780094 (C>T)	Codominante	CC	43 (34,4)	64 (50,4)	0,022*
		CT	68 (54,4)	48 (37,8)	
		TT	14 (11,2)	15 (11,8)	
		Frequência Alelo T [95% IC]	38,4 [32-44]	30,7 [25-36]	0,069
	Dominante	CC/ CT+TT	43/82	64/63	0,010
	Recessivo	TT/ CC+CT	14/111	15/112	0,879
<i>LEPR</i> rs1137100 (A>G)	Codominante	AA	70 (56,0)	73 (57,5)	0,687*
		AG	48 (38,4)	50 (39,4)	
		GG	7 (5,6)	4 (3,1)	
		Frequência Alelo G [95% IC]	24,8 [19-30]	22,8 [18-28]	0,604
<i>LEPR</i> rs1137101 (A>G)	Codominante	AA	43 (34,4)	38 (29,9)	0,228*
		AG	55 (44,0)	69 (54,3)	
		GG	27 (21,6)	20 (15,8)	
		Frequência Alelo G [95% IC]	43,6 [37-50]	42,9 [37-49]	0,876
<i>PPARG</i> rs1801282 (C>G)	Codominante	CC	107 (85,6)	108 (85,0)	0,851*
		CG	17 (13,6)	17 (13,4)	
		GG	1 (0,8)	2 (1,6)	
		Frequência Alelo G [95% IC]	7,6 [4-11]	8,3 [5-12]	0,782
<i>TCF7L2</i> rs7901695 (C>T)	Codominante	TT	52 (41,6)	44 (34,6)	0,413*
		CT	62 (49,6)	67 (52,8)	
		CC	11 (8,8)	16 (12,6)	
		Frequência Alelo C [95% IC]	33,6 [28-39]	39,0 [33-45]	0,209

Genótipos descritos em n (%); P, probabilidade, Teste de Chi-quadrado ou *Teste Exato de Fisher bidirecional. 95% IC: Intervalo de confiança de 95%. P significativos destacados em negrito.

5.3.3 Polimorfismo rs1421085 do gene *FTO*

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas não foram diferentes entre gestantes controle e gestantes com DMG (Tabela 15). As frequências genotípicas do polimorfismo analisado estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos (Anexo 4).

A variante rs1421085 do gene *FTO* não foi associada ao DMG na população estudada, tampouco com os parâmetros analisados (Tabelas 8 e 11) para gestantes controles e com DMG ($P > 0,05$).

Existia uma expectativa em encontrar uma associação entre o polimorfismo rs1421085 do *FTO* com o IMC das gestantes, já que este polimorfismo tem sido associado com obesidade, um fator de risco para diabetes (CHAUHAN *et al.*, 2011). Este polimorfismo foi associado à obesidade em crianças de Portugal (ALBUQUERQUE; NOBREGA; MANCO, 2013). O alelo C foi associado com aumento do IMC em coreanos (CHA *et al.*, 2008). Neste estudo, entretanto, o polimorfismo não se mostrou útil como marcador de risco para DMG. O efeito do tamanho amostral pode ter contribuído para este resultado. Além disso, o efeito fisiológico da presença da variante, localizada numa região intrônica, contribuindo para o maior risco de obesidade e DM ainda precisa ser elucidado.

Pela escassez de estudos abordando a variante rs1421085 do gene *FTO* no diabetes gestacional, as comparações foram feitas entre diferentes condições e populações (Tabela 16).

A frequência do alelo C das gestantes saudáveis deste estudo foi cerca de duas a três vezes maior que as frequências reportadas em europeus, chineses e japoneses (Tabela 16). A presença do alelo C é cerca de 5 vezes menor em africanos (HapMap-YRI) que em gestantes saudáveis deste estudo, e menos frequente que demais populações citadas na Tabela 16.

Apesar de menor, as frequências do alelo C encontradas neste estudo foram próximas aquelas reportadas por Solak e colaboradores (2014), na população turca. Estes pesquisadores também não encontraram associação da variante rs1421085 do *FTO* com IMC ou obesidade. Já outro estudo com caucasianos obesos mostrou associação deste SNP com o IMC, além de apresentar frequência do alelo C superior à das populações citadas na Tabela 17 (HARBON *et al.*, 2014).

TABELA 16 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1421085 DO GENE *FTO* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	N	Genótipo (%)			Alelo (%)
			TT	TC	CC	C
Euro-brasileiras	DMG	127	40,9	48,0	11,1	35,0
	Gestantes saudáveis	125	42,4	41,6	16,0	36,8
(Presente estudo)						
Turcos	Obesos	190	30,5	51,1	18,4	43,9
	Controles	97	28,8	52,6	18,6	44,8
(SOLAK <i>et al.</i> , 2014)						
Caucasianos	Obesos		29,5	30,5	40	55,2
(HARBRON <i>et al.</i> , 2014)						
HapMap-JPT	Japoneses	91	67,1	28,2	4,7	18,8
	Europeus	180	27,4	53,1	19,5	16,7
HapMap-CEU	Chineses Han	90	70,7	24,4	4,9	11,6
HapMap-HCB	Africanos	90	86,7	13,3	0	6,6
HapMap-YRI						

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (C) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável. CEU, residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. HCB, chineses Han em Beijing. JPT, japoneses em Tóquio. YRI, africanos yoruba em Ibadan, Nigéria.

Este parece ser o primeiro estudo sobre a frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs1421085 do *FTO* em gestantes sul-brasileiras com e sem DMG.

Em conclusão, o polimorfismo rs1421085 em estudo não se mostrou associado ao DMG na população estudada.

5.3.4 Polimorfismo rs780094 do gene *GCKR*

A GCKRP é uma proteína que regula a atividade da glucoquinase. Polimorfismos no gene *GCKR*, que codifica a GCKRP, podem promover um aumento na atividade da GCK com redução nas concentrações glicêmicas, e, consequentemente, redução do risco para DM.

A variante rs780094 do gene *GCKR* foi associada ao DMG na população estudada, nos modelos codominante e dominante ($P=0,022$ e $P=0,010$, respectivamente), conferindo ao alelo T o caráter protetor para DMG. As frequências genotípicas do polimorfismo analisado estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos (Anexo 4).

O alelo C do rs780094 do *GCKR* foi associado com aumento de 1,25 vezes no risco de desenvolver DMG em finlandesas (HUOPIO *et al.*, 2013), em concordância com nossos achados.

A Tabela 17 mostra as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs780094 do *GCKR* em diferentes populações e estudos.

TABELA 17 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7800945 DO GENE *GCKR* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			CC	CT	TT	T
Euro-brasileiras	DMG	127	50,4	37,8	11,8	30,7
	Gestantes saudáveis	125	34,4	54,4	11,2	38,4
(Presente estudo)						
Finlandesas	DMG	526				37,0
	Gestantes saudáveis	404				32,0
(HUOPIO <i>et al.</i> , 2013)						
Dinamarqueses	DM2	3878	42	46	12	34,9
	Controles	4891	45	43	12	33,1
(SPARSO <i>et al.</i> , 2008)						
Caucasianas	DMG					42
Afro-americanas	DMG					14
(STUEBE <i>et al.</i> , 2014)						
Chineses	Misto (DM2 e obesos)	2894	19,6	51,1	29,3	45,2
(QI <i>et al.</i> , 2009)						
Japoneses	Disglicemia	283	25,1	48,1	26,8	50,9
	Controles	1747	21,2	49,4	29,4	54,1
(HISHIDA <i>et al.</i> , 2012)						

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (T) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável.

A associação entre o alelo T e o aumento de triglicérides foi fortemente demonstrada em um estudo que analisou diversas populações (ORHO-MELANDER *et al.*, 2008); no entanto, não foi evidenciada no presente estudo. É possível que o tamanho amostral possa ter influenciado neste resultado.

A frequência do alelo T em chineses obesos e com DM2 foi associada a concentrações elevadas de triglicérides, mas também com menor IMC e menor risco para DM2 (QI *et al.*, 2009). Chineses Han portadores do alelo C apresentaram 1,22 vezes mais risco de desenvolver DM2 que os portadores do alelo protetor, T (LING *et al.*, 2011).

A frequência do alelo T foi semelhante às aquelas reportadas para gestantes finlandesas e dinamarquesas com DM2 e menores que as frequências em orientais. Afro-americanas com DMG apresentaram menor frequência comparado com as gestantes com DMG neste estudo (Tabela 17), provavelmente pelas diferenças étnicas das populações.

Em nosso estudo, gestantes portadores do alelo T (protetor) apresentam uma redução no risco de desenvolver DMG de 1,41 (*Odds ratio*; 95%IC, 0,97-2,03). Este polimorfismo foi o que mostrou ser mais promissor para estudos de associação com DMG. A glucoquinase é uma enzima que fosforila a glicose e faz o sensoriamento da glicose intracelular regulando a liberação de insulina. A proteína reguladora da glucoquinase tem potencial para afetar a função desta enzima e, portanto, afetar a glicemia. O efeito do polimorfismo rs780094 sobre a expressão do gene *GCKR* não é conhecido. Sparso e colaboradores (2008) propõem que este polimorfismo intrônico está em desequilíbrio de ligação com outros genes próximos, os quais seriam os responsáveis pelo efeito sobre as concentrações de glicose ou triglicérides.

Também, não evidenciamos associação do polimorfismo rs780094 com as concentrações de glicose, hemoglobina glicada ou triglicérides, utilizando análise de correlação, análise de variância ou teste de Kruskal-Wallis. As características da população com DMG estudada, como o controle glicêmico e dietético, associado ao tamanho amostral, podem ser fatores adicionais que não permitiram evidenciar estas associações.

Em nosso estudo, o polimorfismo rs780094 do gene *GCKR* foi associado ao risco reduzido para desenvolver DMG e as frequências alélicas foram similares às descritas para caucasianos.

5.3.5 Polimorfismos rs1137100 e rs1137101 do gene *LEPR*

A leptina, hormônio produzido pelas células adiposas, está associada ao balanço energético, afetando o peso do indivíduo. Portanto, variações no gene do receptor da leptina (*LEPR*), essencial para a ação deste hormônio, tem potencial para interferir nas concentrações glicêmicas, quer por favorecer a resistência à insulina (obesidade), ou por modular ou contrapor a ação de hormônios orexígenos.

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs1137100 e rs1137101 não foram diferentes ($P>0,05$) entre gestantes saudáveis e aquelas com DMG neste estudo, conforme demonstrado na Tabela 15. As frequências genotípicas dos polimorfismos do gene *LEPR* analisados estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos (Anexo 4).

As variantes rs1137100 e rs1137101 do *LEPR* não foram associadas ao DMG na população estudada, tampouco com os parâmetros analisados descritos nas Tabelas 7 e 10, em ambos os grupos em estudo ($P>0,05$). As tabelas 18 e 19 mostram as frequências genotípicas e alélicas das variantes rs1137110 e rs1137101 do gene *LEPR*, respectivamente.

Não foram encontrados na literatura outros estudos que tenham analisado esta variante em DMG; então as comparações foram feitas entre diferentes populações (Tabelas 18 e 19). Não temos conhecimento sobre outros estudos com a frequência alélica e genotípica destas variantes do gene *LEPR* em gestantes saudáveis e gestantes com DMG brasileiras.

A frequência do alelo G do rs1137100, no presente estudo, foi maior que a frequência relatada em africanos, e significativamente menor que a de orientais. A composição étnica da amostra deste estudo é a provável razão da similaridade entre as frequências aqui encontradas com as frequências relatadas para ingleses, franceses e europeus em geral.

As concentrações de leptina estão associadas com adiposidade e resistência à insulina, e tem sido reportado que pessoas portadoras do genótipo AA do rs1137100 do gene *LEPR* apresentam concentrações maiores de leptina que aqueles portadores do alelo G.

Embora a função dessa variante ainda não esteja elucidada, ela foi associada com a promoção de uma modificação no domínio extracelular do receptor *LEPR* com alteração na afinidade de ligação com a leptina (TABASSUM *et al.*, 2012). Neste estudo, não foi possível verificar a associação do polimorfismo com a obesidade, IMC, alterações lipídicas ou glicêmicas.

TABELA 18 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1137100 DO GENE *LEPR* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			AA	AG	GG	G
Euro-brasileiras	DMG	127	57,5	39,4	3,1	22,8
	Gestantes saudáveis	125	56,0	38,4	5,6	24,8
(Presente estudo)						
HapMap-JPT	Japoneses	91	2,4	40,2	57,3	97,4
	Chineses Han	90	2,5	27,5	70,0	83,7
HapMap-HCB						
Brasileiros	Mineiros com hipertensão	470	42,8	46,8	10,4	33,8
(PENA <i>et al.</i> , 2014)						
HapMap-CEU	Europeus	180	49,6	42,5	8,0	29,2
	Franceses	877	56,7	37,4	5,9	24,6
(PHILLIPS <i>et al.</i> , 2010)	Adultos obesos	877	53,4	39,2	7,4	27,0
	Controles	877	53,4	39,2	7,4	27,0
Ingleses	Adultos obesos	190	54,0	38,0	8,0	27,4
	Controles	132	55,0	39,0	6,0	25,8
(GOTODA <i>et al.</i> , 1997)						
HapMap-YRI	Africanos	90	69,6	27,7	2,7	16,5

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (G) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável. CEU, residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. HCB, chineses Han em Beijing. JPT, japoneses em Tóquio. YRI, africanos yoruba em Ibadan, Nigéria.

A frequência do alelo G para o polimorfismo rs1137101 no presente estudo foi similar àquelas reportadas para europeus, e menores que a de africanos (HapMap). Orientais apresentam o alelo G em frequência significativamente maior que as demais populações (Tabela 19).

Queiroz e colaboradores (2015) estudaram o polimorfismo rs1137101 em crianças e adolescentes brasileiros (Minas Gerais), e a frequência do alelo G foi significativamente maior quando comparado a outras populações (95,7%). Os autores relatam que este polimorfismo pode indicar risco aumentado para doenças cardiovasculares e DM2 na idade adulta para os portadores do alelo A, por ter sido associado ao aumento nas concentrações de LDL-c e maior risco para alterações nas concentrações de insulina. Em nosso estudo a associação entre o SNP e as concentrações de LDL-c nas gestantes com e sem DMG não foi detectada. Também não encontramos explicação convincente para a magnitude da divergência das frequências genotípicas relatadas por Queiroz e colaboradores (2015) com nossos resultados e os de outras populações (Tabela 19). A composição genética da

população estudada por eles (crianças obesas e não obesas) pode produzir peculiaridades, e distorções, que necessitariam de maiores estudos para confirmação.

TABELA 19 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1137101 DO GENE *LEPR* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			AA	AG	GG	G
Euro-brasileiras	DMG	127	29,9	54,3	15,8	42,9
	Gestantes saudáveis	125	34,4	44,0	21,6	43,6
(Presente estudo)						
Ingleses	Obesos	190	29,0	53,0	18,0	44,6
	Controles	132	28,0	58,0	14,0	42,8
(GOTODA <i>et al.</i> , 1997)						
Franceses	Adultos obesos	877	31,6	50,0	18,4	43,4
	Controles	877	31,6	47,1	21,3	44,9
(PHILLIPS <i>et al.</i> , 2010)						
HapMap-CEU	Europeus	180	25,9	53,6	20,5	47,3
HapMap-YRI	Africanos	90	11,1	58,3	30,6	59,7
HapMap-JPT	Japoneses	91	1,2	30,5	68,3	83,5
HapMap-HCB	Chineses Han	90	2,2	17,8	80,0	88,9
Brasileiros	Crianças e adolescentes	403	0,3	8,1	91,6	95,7
(QUEIROZ <i>et al.</i> , 2015)						

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (G) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável. CEU, residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. HCB, chineses Han em Beijing. JPT, japoneses em Tóquio. YRI, africanos yoruba em Ibadan, Nigéria.

Embora existam evidências da associação do rs1137101 com a obesidade (YIANNAKOURIS *et al.*, 2001), alguns autores não puderam confirmar esta associação (CONSTANTIN *et al.*, 2010; BENDER *et al.*, 2011). As discordâncias entre os achados podem ser explicadas pelas diferentes frequências alélicas entre os grupos étnicos.

Em síntese os polimorfismos rs1137100 e rs1137101 do gene *LEPR* não foram associados ao DMG e as frequências alélicas são similares àquelas descritas para caucasianos.

5.3.6 Polimorfismo rs1801282 do gene *PPARg*

O fator de transcrição *PPARg* tem sido extensivamente explorado em estudo de associação com DM e suas complicações.

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas da variante genética selecionada não foram diferentes entre gestantes saudáveis e gestantes com DMG (Tabela 15). As frequências genotípicas do polimorfismo rs1801282 estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos (Anexo 4).

O polimorfismo rs1801282 do gene *PPARg* não foi associado ($P>0,05$) com DMG na população estudada, tampouco com os parâmetros analisados descritos nas Tabelas 8 e 11 para gestantes saudáveis e aquela com DMG (Tabela 16). A tabela 21 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo rs1801282 do gene *PPARg* em outros estudos e populações.

O polimorfismo rs1801282 é uma variação funcional que promove a substituição do aminoácido prolina (Pro, alelo C) pela alanina (Ala, alelo G). Catalano e colaboradores (2008) encontraram associação entre a presença do alelo G e risco aumentado para doença arterial periférica e baixas concentrações de sRAGE.

Um estudo de meta-análise, envolvendo 30 estudos independentes, mostrou que o polimorfismo rs1801282 do gene *PPARg* pode ser um modificador genético da obesidade (MASUD; YE; GROUP, 2003). Discrepâncias entre indivíduos magros e obesos pode indicar uma interação do alelo G rs1801282 com outros fatores genéticos e/ou ambientais (TOK *et al.*, 2006).

A presença do alelo G foi associada à redução da atividade do *PPARg* que promove redução de tecido adiposo, o que melhora a sensibilidade à ação da insulina. Este processo protege os portadores do alelo G contra o desenvolvimento de DM2 (WANG *et al.*, 2013). Já em uma população dinamarquesa, não foi observada associação do polimorfismo com o DM2 (LAUENBORG *et al.*, 2009). Os resultados são controversos.

Em gestantes com DMG este polimorfismo foi associado ao ganho de peso (TOK *et al.*, 2006; STUEBE *et al.*, 2014). Em francesas, a presença do genótipo GG do polimorfismo rs1801282 foi associada a um IMC mais alto antes da gestação, maior taxa de obesidade pré-gestação, porém uma redução de 50% no risco de desenvolver DMG (HEUDE *et al.*, 2011). Em concordância com nosso estudo, não

foi observada nenhuma associação da variante com o DMG em coreanas (CHO *et al.*, 2009), escandinavas e árabes (SHAAT *et al.*, 2004).

TABELA 20 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1801282 DO GENE *PPAR γ* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			CC	CG	GG	G
Euro-brasileiras	DMG	127	85	13,4	1,6	8,3
	Gestantes saudáveis	125	85,6	13,6	0,8	7,6
(Presente estudo)						
Turcas	DMG	62	80,64	19,36	0	19,4
	Controles saudáveis	100	84	16	0	16,0
(TOK <i>et al.</i> , 2006)						
Dinamarqueses	DM2	1461	76	22	2	13,0
	Controles saudáveis	4986	75	23	2	13,9
(HANSEN <i>et al.</i> , 2005)						
Escandinavas	DMG	400	71,5	27,7	0,8	14,6
	Gestantes saudáveis	428	74,1	24,5	1,4	13,7
Árabes	DMG	100	91	9	0	4,5
	Gestantes saudáveis	122	86,9	12,3	0,8	7,0
(SHAAT <i>et al.</i> , 2004)						
Dinamarquesas caucasianas	DMG	283	75,8	22,6	1,5	12,8
	Mulheres tolerantes à glicose	2446	75,1	22,7	2,1	13,5
(LAUENBORG <i>et al.</i> , 2009)						
Escandinavas	DMG	637	73,5	24,8	1,7	14,1
	Controles saudáveis	1232	74,5	24,2	1,3	13,4
(SHAAT <i>et al.</i> , 2007)						
Italianos	Doença arterial periférica	201	74,1	23,9	2,0	14,0
	Controles saudáveis	201	86,4	14,9	0,5	8,0
(CATALANO <i>et al.</i> , 2008)						
Francesas	Mulheres (mães) tolerantes à glicose	1708	80	19	1	10,4
(HEUDE <i>et al.</i> , 2011)						
Sul-Brasileiros	Indivíduos com IMC entre 16,2 e 42,4kg/m ²	335	84,5	14,0	1,5	9,0
(MATTEVI; ZEMBRZUSKI; HUTZ, 2007)						
Coreanas	DMG	869	91,7	8,2	0,1	4,0
	Gestantes saudáveis	632	89,7	10,0	0,3	5,0
(CHO <i>et al.</i> , 2009)						
Chinesas	DMG	55	94,6	5,5	0	3,0
	Controles saudáveis	173	90,8	9,2	0	5,0
(CHENG, Y. <i>et al.</i> , 2010)						
Gregas	DMG	148	96,6	3,4	0	3,0
	Gestantes saudáveis	107	93,46	6,54	0	2,0
(PAPPA <i>et al.</i> , 2011)						
Coreanas	DMG	94	94,6	5,4	0	2,7
	Gestantes saudáveis	41	82,9	17,1	0	8,5
(CHON <i>et al.</i> , 2013)						

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (C) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável.

A distribuição genotípica encontrada neste estudo foi similar àquela encontrada por Mattevi e colaboradores (2007) que avaliaram sul-Brasileiros com IMC entre 16,2 e 42,4kg/m². A frequência do alelo G deste estudo também é similar a encontrada em nosso grupo controle (9 *versus* 7,6%), fato que pode ser explicado pela semelhança étnica da população dos dois estudos.

As frequências do alelo G obtidas neste estudo (predomínio de Euro-brasileiras) foram similares às das francesas, e maior que as populações árabes, gregas, coreanas e chinesas. Dinamarquesas, escandinavas e turcas apresentaram uma frequência maior do alelo G em comparação com a população deste estudo e de orientais (Tabela 20). As diferenças populacionais podem explicar este achado.

Em síntese, o polimorfismo rs1801282 não foi associado ao DMG e as frequências alélicas são similares às populações de origem Caucasiana.

5.3.7 Polimorfismo rs7901695 do gene *TCF7L2*

O *TCF7L2* é um fator de transcrição envolvido na estimulação da proliferação das células-beta pancreáticas e na produção do GLP1, que estimula a secreção de insulina; e o gene *TCF7L2* tem sido associado ao DM2 em diferentes populações (SHAAT *et al.*, 2007; FREATHY *et al.*, 2010; STUEBE *et al.*, 2014).

Neste estudo, as frequências alélicas e genotípicas da variante rs7901695 do gene *TCF7L2* não foram diferentes ($P > 0,05$) entre gestantes saudáveis e aquelas com DMG (Tabela 15). As frequências genotípicas do polimorfismo analisado estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos (Anexo 4).

Variante polimórficas no *TCF7L2* modulam a glicemia e a secreção de insulina e a associação da variante rs7901695 com o DMG já foi descrita anteriormente em caucasianas (STUEBE *et al.*, 2014). Outro polimorfismo do gene *TCF7L2* (rs7903146), que está em desequilíbrio de ligação com a variante analisada neste estudo, já foi associado com DMG em dinamarquesas (LAUENBORG *et al.*, 2009), australianas (FREATHY *et al.*, 2010), gregas (PAPPA *et al.*, 2011) e suecas (SHAAT *et al.*, 2007). Com base nestas informações, esperávamos encontrar associação entre o SNP rs7901695 e o DMG na população estudada, o que não ocorreu. A variante também não mostrou associação com os parâmetros analisados

(Tabelas 7 e 10) para gestantes saudáveis e aquelas com DMG. A Tabela 21 mostra as frequências genotípicas e alélicas em diferentes populações.

O alelo C do rs7901895 é mais frequente na população africana (Tabela 21). A frequência encontrada nas gestantes saudáveis deste estudo é semelhante àquelas relatadas para europeus em geral e gestantes suecas e espanholas. No presente estudo, as gestantes com DMG mostraram frequência similar à de gestantes com DMG espanholas, caucasianas e afro-americana, e discretamente maior que das DMG suecas. Orientais apresentam uma frequência menor que 5% do alelo C. O fator étnico pode ser o responsável por estas diferenças.

O polimorfismo rs7901895 não foi associado ao DMG neste estudo e apresenta frequências similares a outras populações Caucasianas.

TABELA 21 – COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7901895 DO GENE *TCF7L2* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			TT	TC	CC	C
Euro-brasileiras	DMG	127	34,6	52,8	12,6	39,0
	Gestantes saudáveis	125	41,6	49,6	8,8	33,6
(Presente estudo)						
	Africanos	90	27,4	56,5	15,9	44,2
HapMap-YRI						
Caucasianas	DMG					30
Afro-americanas	DMG					40
(STUEBE <i>et al.</i> , 2014)						
Espanholas	DMG	45	38	44	18	40
	Gestantes saudáveis	25	40	52	8	34
(PAGAN <i>et al.</i> , 2014)						
Suecas	DMG	1102	51,2	34,2	7,6	26,5
	Gestantes saudáveis	794	34,2	43,1	11,5	34,4
(PAPADOPOULOU <i>et al.</i> , 2011)						
	Europeus	180	54,5	34,8	10,7	28,1
HapMap-CEU						
Suecos	DM2	825	52,6	39,9	7,5	27,5
	Controles saudáveis	793	59,2	36,0	4,8	22,8
(MAYANS <i>et al.</i> , 2007)						
	Japoneses	91	94,2	4,7	0,1	3,5
HapMap-JPT						
	Chineses Han	90	95,3	4,7	0	2,3
HapMap-HCB						

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (C) que são diferentes do intervalo de confiança (95%) para o grupo saudável. CEU, residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. HCB, chineses Han em Beijing. JPT, japoneses em Tóquio. YRI, africanos yoruba em Ibadan, Nigéria.

5.4 ISOFORMAS SOLÚVEIS DE RAGE NO DM2

As isoformas de RAGE (sRAGE) têm sido estudadas como marcadores de progressão de doenças, principalmente das complicações do DM (PRASAD, 2014; KAJIKAWA *et al.*, 2015). Com base nessa premissa, foram selecionados 44 pacientes com DM2 que apresentaram alguma complicação vascular (retinopatia, IAM, neuropatia e/ou nefropatia) e concentrações de HbA1c superiores à meta terapêutica de 7%, o que caracteriza um pobre controle glicêmico. Para comparações, foram também selecionados 44 participantes do grupo controle, pareados por gênero e idade. Neste subgrupo (n=88) foram dosadas as concentrações plasmáticas de sRAGE e esRAGE, conforme descrito no item 4.5, a fim de verificar possíveis associações. Este foi um estudo prospectivo com tamanho amostral reduzido, o que pode afetar as conclusões.

A Tabela 22 descreve as características do subgrupo estudado, separados por gênero.

Tabela 22 – COMPARAÇÕES ENTRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE sRAGE E esRAGE NOS SUBGRUPOS COM DM2 E CONTROLES

	Controles			DM2		
	Homens (n=17)	Mulheres (n=27)	P*	Homens (n=17)	Mulheres (n=27)	P*
Idade (anos)	59,8 ± 4,1	58,7 ± 4,5	0,400	59,6 ± 6,4	61,8 ± 10,5	0,439
GLI (mg/dL)	98 (84 – 109)	86,0 (79 – 95)	0,051*	133 (110 – 162)	176 (112 – 242)	0,158*
HbA1c (%)	5,2 (5,1 – 5,6)	5,2 (5,1 – 5,4)	0,104*	8,0 (7,8 – 9,3)	8,9 (7,8 – 11,2)	0,138*
1,5AG (µg/mL)	26,2 (20,6 – 30,4)	24,0 (19,3 – 29,3)	0,598*	7,3 (5,9 – 10,2)	6,7 (4,4 – 15,9)	0,923*
IMC (kg/m²)	26,0 ± 3,5	26,4 ± 3,3	0,725	29,5 ± 5,3	32,1 ± 6,9	0,196
CREA (mg/dL)	0,76 (0,65 – 0,81)	0,64 (0,48 – 0,77)	0,533*	1,00 (0,90 – 1,30)	0,80 (0,70 – 1,00)	0,039*
sRAGE (pg/mL)	760,0 (580-1880)	1420,0 (1010-1870)	0,336*	860,0 (580-1110)	1130,0 (780-1840)	0,065*
esRAGE (ng/mL)	0,376 ± 0,26	0,379 ± 0,14	0,961	0,310 ± 0,17	0,367 ± 0,26	0,486

P, Probabilidade; teste t-Student ou *Mann-Whitney; Comparação entre sexo, no mesmo grupo. GLI: glicose plasmática sem jejum. CREA: creatinina plasmática

Comparando homens e mulheres dentro dos subgrupos não houve diferença significativa nos parâmetros analisados. Logo, cada subgrupo (controles e DM2) foi analisado na sua totalidade ($n=44$), sem separação por gênero; mas também não mostraram diferenças. A Figura 16 destaca esta informação para os parâmetros sRAGE e esRAGE. Ao contrário, Skrha e colaboradores (2012) mostraram que as concentrações de sRAGE foram maiores em DM1 comparado com controles (1137 ± 532 ng/l vs. 824 ± 309 ng/l, $p<0.01$); e esRAGE foi maior em DM1 e DM2 que nos controles.

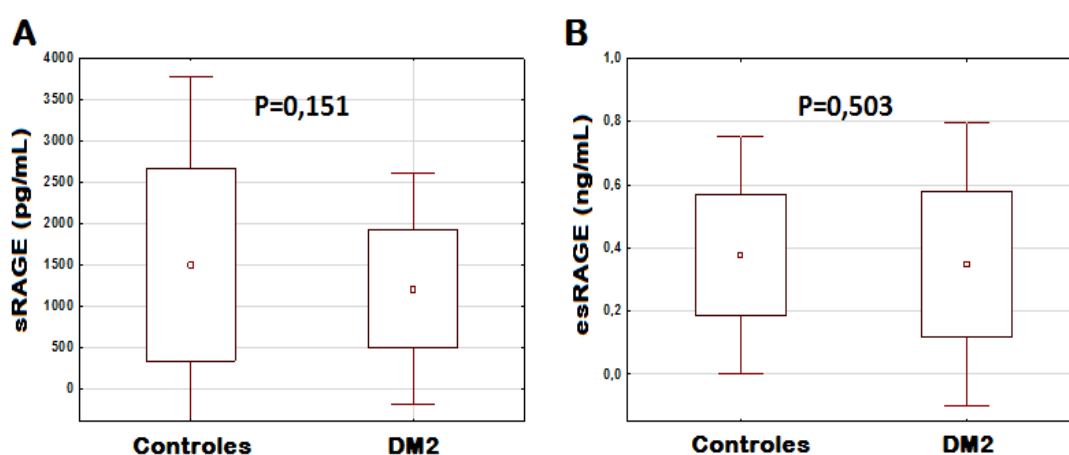


Figura 16 – Comparação entre as concentrações de sRAGE e esRAGE entre os subgrupos de controles e DM2.

Controles ($n=44$) e DM 2 ($n=44$), pareados por sexo e idade, foram comparados pelas concentrações séricas de (A) sRAGE (pg/mL) e (B) esRAGE (ng/mL) com Teste t-Student bidirecional.

Todos os pacientes com DM2 selecionados para este experimento apresentavam pelo menos uma complicação vascular. As mulheres apresentaram uma maior frequência de complicações vasculares comparado aos homens. Uma possível explicação pode ser dada observando o valor médio da HbA1c das mulheres (8,9% *versus* 8,0% dos homens). Uma das 27 mulheres apresentou 3 complicações associadas: retinopatia, neuropatia e IAM. O valor de sua HbA1c era de 10% e glicemia em jejum, 185 mg/dL (valores não mostrados), refletindo o pobre controle glicêmico.

A Figura 17 ilustra a distribuição das complicações vasculares entre os homens e mulheres do subgrupo DM2.

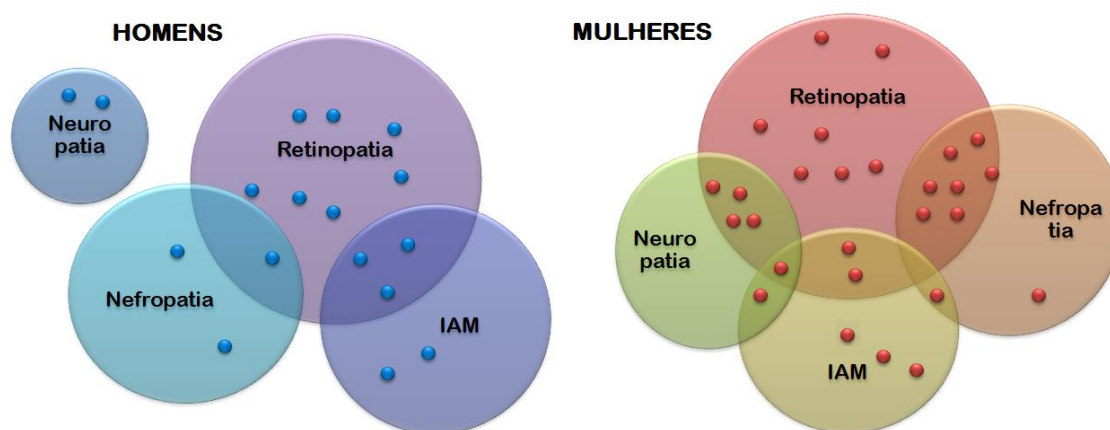


Figura 17 – Distribuição das complicações vasculares no subgrupo DM2, por gênero.

Os pontos azuis representam os 17 homens com DM2; e, os pontos vermelhos representam as 27 mulheres com DM2. Os pontos (azuis e vermelhos) estão posicionados dentro dos círculos maiores que representam as complicações do DM que cada paciente com DM2 apresenta (alguns apresentam mais de uma complicação e estão posicionados nas interseções dos círculos maiores).

As frequências de complicações vasculares entre homens e mulheres do subgrupo DM2 (Tabela 23), não foram diferentes ($P=0,713$; Chi-quadrado).

TABELA 23 – COMPLICAÇÕES VASCULARES NO SUBGRUPO DM2 E CORRELAÇÕES COM OUTROS PARÂMETROS

	Complicações vasculares no subgrupo DM2			
	Homens	Mulheres		
Retinopatia	11 (64,7%)	21 (77,8%)		
IMC	5 (29,4%)	6 (22,2%)		
Nefropatia	3 (17,6%)	9 (33,3%)		
Neuropatia	2 (11,7%)	6 (22,2%)		
P=0,713*				
Correlações positivas do subgrupo DM2				
	IMC	Glicemia	Ácido Úrico	1,5AG
sRAGE	r=0,327 P=0,030**	r=0,335 P=0,026**	N	r=0,446 P=0,002**
esRAGE	N	r=0,320 P=0,034**	r=0,310 P=0,041**	r=0,563 P<0,001**

P, Probabilidade; *Teste do Chi-quadrado; comparação entre sexo, no mesmo grupo; **Análise de Correlação de Pearson. N, não houve correlação.

Embora moderadas, correlações positivas foram encontradas entre sRAGE e IMC, glicemia e 1,5AG; e entre esRAGE e glicemia, ácido úrico e 1,5AG, conforme relatado na Tabela 23. Ao contrário da glicemia e do 1,5AG, a HbA1c não apresentou correlação com nenhuma das isoformas solúveis de RAGE ($P>0,05$).

O 1,5AG é um marcador de hiperglicemia pós-prandial, e é útil em pacientes com HbA1c entre 6 e 8% (bom a moderado controle glicêmico). Os pacientes do subgrupo DM2 apresentam um pobre controle glicêmico ($HbA1c >8,0\%$), e o 1,5AG teve correlação positiva tanto com sRAGE quanto esRAGE (SMITH-PALMER *et al.*, 2014).

Neste estudo, as concentrações de sRAGE foram associadas ao IMC; ao contrário de um estudo realizado com italianos saudáveis, onde as concentrações séricas de sRAGE apresentaram correlação negativa com o IMC (NORATA *et al.*, 2009). Apesar da diferença não ser significativa em nosso estudo, as concentrações médias de sRAGE foram maiores em mulheres saudáveis que em homens saudáveis, em concordância com os dados de Norata e colaboradores (2009). É possível que as concentrações de sRAGE reflitam um estado de alteração metabólica em indivíduos saudáveis, que precede o DM e complicações vasculares.

As concentrações de esRAGE não foram associadas com o IMC; diferente de um estudo com japoneses que relatou associação inversa entre esRAGE e o IMC ($r=-0,305$; $P=0,044$), indicando que o esRAGE possa desempenhar um papel protetor contra componentes da síndrome metabólica, como a obesidade (KOYAMA *et al.*, 2005).

No presente estudo houve correlação significativa entre esRAGE e ácido úrico (Tabela 24). O ácido úrico está associado a moléculas inflamatórias e disfunção endotelial (BO *et al.*, 2008), base das complicações vasculares do DM. Coreanos com DM2 apresentaram concentrações menores de esRAGE quando comparados aos controles, e as concentrações foram associadas com inflamação e rigidez arterial, processos envolvidos na aterosclerose (CHOI, K. M. *et al.*, 2009).

Variações genéticas no *RAGE* e no *MMP9* poderiam afetar a produção das isoformas solúveis de RAGE por *splicing* alternativo ou pela clivagem proteolítica, afetando as concentrações de sRAGE e esRAGE. Neste estudo a análise de correlação entre as variantes rs3134945 do *RAGE* e rs17576 do *MMP9* e as concentrações desses parâmetros não foi significativa ($p>0,05$); porém o pequeno tamanho amostral ($n=44$) não permite conclusões definitivas. Além disso, não se

sabe se a presença destas variantes afeta a atividade da MMP9 e do RAGE, já que a determinação das concentrações das isoformas solúveis de RAGE por enzimaímunoensaio não permite verificar a atividade dessas proteínas. Não podemos garantir que a concentração presente reflita a funcionalidade da proteína.

Um resumo de estudos de associação entre sRAGE e esRAGE e complicações do DM encontra-se no Anexo 5.

5.5 ANÁLISE DE BIOMARCADORES GLICÊMICOS EM DOADORES DE SANGUE

Durante a execução do presente estudo, amostras obtidas de doadores de sangue saudáveis foram coletadas e analisadas para composição do grupo controle. Embora não sendo um objetivo do trabalho, os resultados dos parâmetros bioquímicos do grupo controle mostraram potencial para a realização de experimentos, cujos resultados podem auxiliar outras pesquisas.

A seguir estão relatados os experimentos realizados com as amostras do grupo controle. Os resultados foram compilados e submetidos para publicação.

5.5.1 “O banco de sangue na triagem do diabetes: uma alternativa válida?”

Candidatos à doação de sangue passam por triagem clínica e sorológica antes da coleta. Segundo a Portaria nº 2.712 do Ministério da Saúde, de 12 de novembro de 2013, que redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos, o DM (tipo 1 ou tipo 2 em uso de insulina) está entre as principais causas de inaptidão definitiva para doação de sangue. Doadores com DM2 controlado com dieta ou hipoglicemiantes orais podem doar sangue mediante atestado médico de bom controle glicêmico e ausência de complicações vasculares (BRASIL, 2013). Logo, os candidatos à doação de sangue são questionados sobre a presença ou não de DM antes do início da coleta de sangue.

O grupo controle utilizado neste estudo foi selecionado no Banco de Sangue do HC-UFPR. Doadores de sangue saudáveis, com idade entre 18 e 69 anos, de ambos os sexos foram incluídos no estudo; e, aqueles que declararam durante a triagem clínica apresentar qualquer tipo de DM, conforme descrito no tópico 4.1, foram excluídos.

Entre os 5636 candidatos à doação entrevistados no período, 635 doadores (11,3%) atenderam os critérios de inclusão e exclusão (Figura 14), e aceitaram participar do estudo através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Durante as dosagens dos parâmetros bioquímicos desses 635 participantes que seriam selecionados para parear com os grupos DM1 e DM2 (n=415), foram detectadas amostras com concentrações de HbA1c maiores que 5,6%. A partir desta observação, decidimos investigar a frequência de DM sem diagnóstico entre doadores de sangue e a possibilidade de hemocentros participarem da triagem desta patologia.

A amostra (n=635) foi classificada em três grupos segundo a concentração de HbA1c: (1) HbA1c <5,7% (baixo risco para desenvolver DM); (2) HbA1c 5,7-6,4% (pré-diabetes); e, (3) HbA1c ≥6,5% (diabetes), conforme critérios descritos nas principais Diretrizes em Diabetes (ADA, 2015; SBD, 2015).

Paralelamente, após a exclusão dos participantes com concentração de HbA1c inferior a 5,0% e superior a 6,5%, uma subamostra (n=576) também foi classificada quanto ao risco de desenvolvimento de DM em 5 anos, proposto pela revisão sistemática de Zhang e colaboradores (2010). Os outros três grupos de risco definidos foram: (1) HbA1c 5-5,5% (risco DM <9%); (2) HbA1c 5,5-6,0% (risco DM 9-25%); e, (3) HbA1c 6,0-6,5% (risco DM 25-50%). A Tabela 24 apresenta as características antropométricas e laboratoriais da amostra analisada neste experimento.

TABELA 24 – CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE DOADORES DE SANGUE, CLASSIFICADOS POR GÊNERO.

Parâmetros	Homens (n=324)	Mulheres (n=311)	P
Idade (anos)	41 (29,5 – 47)	41 (28,5 – 47)	0,924
Peso (kg)	80 (72 – 91,5)	67 (61 – 75,5)	<0,001
Altura (cm)	174,5 (170 – 180)	163 (159 – 167)	<0,001
IMC (kg/m ²)	26,8 ± 4,1	26,1 ± 4,2	0,041*
Glicemia (mg/dL)	100,4 ± 20,3	95,5 ± 18,3	0,001*
HbA1c (%)	5,3 (5,1 – 5,5)	5,3 (5,1 – 5,5)	0,074
Ureia (mg/dL)	27 (23 – 31)	22 (19 – 27)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,70 (0,61 – 0,79)	0,54 (0,46 – 0,65)	<0,001

IMC: Índice de Massa Corpórea. Valores são média±desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). P, probabilidade teste Mann-Whitney ou *teste t-Student. Todas as amostras foram obtidas sem jejum.

Os participantes apresentaram mediana de idade em 41 anos, sem diferença significativa entre os gêneros. Neste estudo, os homens apresentaram maior peso, altura e IMC quando comparados às mulheres.

Entre os parâmetros bioquímicos, a glicemia, ureia e creatinina foram significativamente maiores para os homens ($P < 0,001$). A concentração de HbA1c foi igual entre os gêneros e dentro dos valores de referência praticados pelo nosso laboratório de análises clínicas, que é de 4,0 a 6,0% (A1C-2 Tina-Quant® Hemoglobina A1c Gen 2; Roche Diagnostica Brasil).

A determinação da concentração de HbA1c dos doadores de sangue que se declararam não diabéticos ($n=635$) caracterizou 57 indivíduos (9,0%) com risco aumentado para desenvolver DM (HbA1c 5,7-6,4%) e 3 indivíduos (0,5%) com concentrações indicativas de DM (HbA1c $\geq 6,5\%$), como mostrado na Figura 18. A pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel 2013) coletou dados nas 26 capitais e no Distrito Federal do Brasil, ouvindo 53 mil pessoas no ano de 2013, e o percentual de pessoas que se declararam diabéticas foi de 6,9% (BRASIL, 2013). Esta frequência é subestimada, pois não contempla aqueles que não sabem que são diabéticos (SACKS *et al.*, 2011). E os resultados encontrados no presente estudo reforçam esta questão.

Os doadores também foram classificados quanto ao risco para desenvolvimento de DM em 5 anos, utilizando as concentrações de HbA1c (ZHANG *et al.*, 2010). Assim, 79% foram classificados como risco discreto (risco $< 9\%$), 19,3% com risco moderado (risco entre 9-25%) e 1,7% com alto risco (risco entre 25-50%), como mostra a Figura 18. Esta informação poderia ser útil ao doador, para implementar e motivar alterações no seu estilo de vida e a procura de acompanhamento profissional.

As características antropométricas e laboratoriais dos participantes, estratificados pelo risco para DM em 5 anos, estão mostradas na Tabela 26. O risco maior para DM, na amostra em estudo, está associado a maior idade, peso, IMC e concentração de glicose sem jejum ($P < 0,001$). As concentrações séricas de ureia, creatinina e albumina não foram associadas ao risco para DM no estudo ($P > 0,05$).

Entre os fatores associados ao maior risco para o DM, a idade superior a 40 anos e o IMC superior a 26 kg/m² foram identificados neste estudo e são amplamente reconhecidos na literatura (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006; SATTAR; GILL, 2014). A frequência de DM2 é maior em adultos e aumenta com o

incremento da idade, entretanto nos últimos anos a incidência vem abrangendo adultos jovens, principalmente aqueles com IMC elevado (WILMOT; IDRIS, 2014).

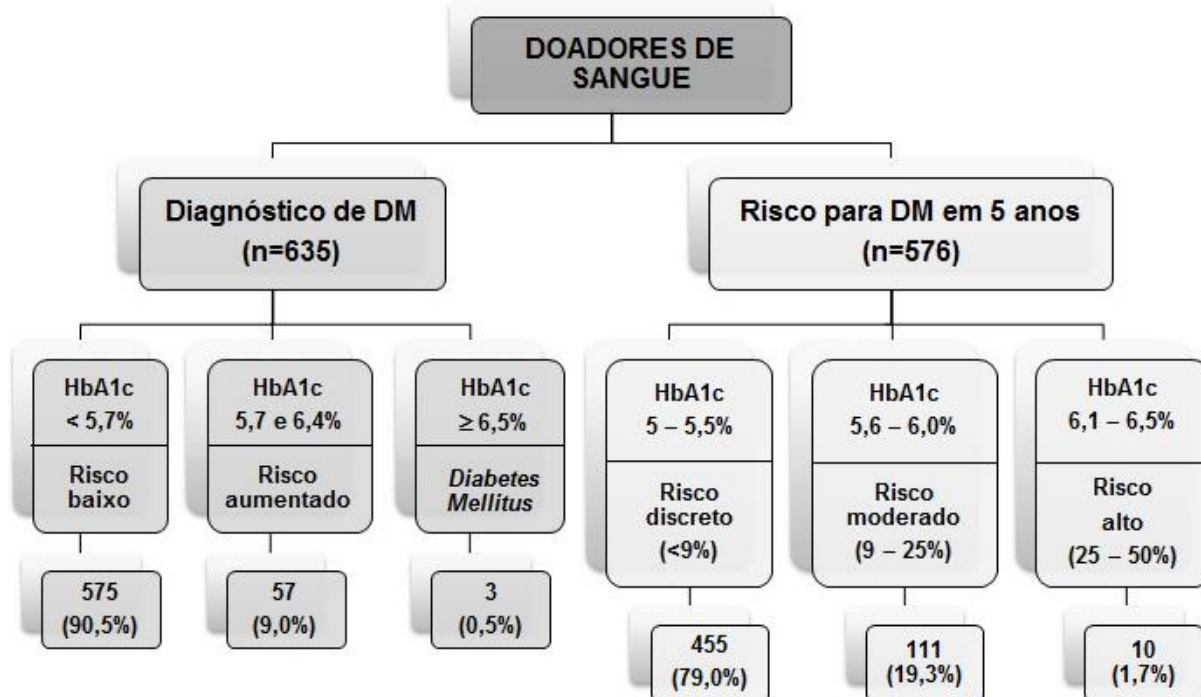


Figura 18 – Classificação da amostra através da HbA1c, estratificada para diagnóstico do DM e quanto ao risco para desenvolver DM em cinco anos.

Estratificação para diagnóstico segundo ADA e SBD; e estratificação de risco para DM em 5 anos, conforme proposto por Zhang e colaboradores (2010).

TABELA 25 – PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E LABORATORIAIS ASSOCIADOS AOS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	HbA1c			P
	Risco baixo (<5,7%) n=575 (90,5%)	Risco aumentado (5,7-6,4%) n=57 (9,0%)	Diabetes (≥6,5%) n=3 (0,5%)	
Idade, anos	40 (28-46)	45 (42-50)	52 (39-59)	<0,001
Homens/Mulheres	288/287	34/23	2/1	0,144**
Peso, kg	73 (64-83)	83 (74-95)	80 (56-82)	<0,001
Altura, cm	169 (162-175)	170 (165-177)	165 (162-181)	0,149
IMC, kg/m ²	26,3±4,0	28,9±4,9	25,3±4,0	<0,001*
Glicemia, mg/dL	91 (81-104)	99 (90-111)	109 (96-214)	<0,001
Ureia, mg/dL	24 (21-30)	25 (21-28)	27 (20-42)	0,983
Creatinina, mg/dL	0,63 (0,51-0,75)	0,61 (0,52-0,69)	0,71 (0,22-0,76)	0,225
Albumina, g/dL	4,0 (3,8-4,1)	3,9 (3,8-4,1)	4,1 (3,7-4,3)	0,130

P, probabilidade, teste de Mann-Whitney, *teste t-Student ou teste **Chi-quadrado. Os grupos Risco aumentado e Diabetes foram combinados para as comparações estatísticas apresentadas.

A glicemia, embora seja maior nos indivíduos com risco aumentado para DM (Tabela 25), apresenta maior dificuldade na análise. Doadores de sangue são estimulados e orientados a se alimentarem antes da doação. A ausência de jejum afeta a glicemia e a torna um marcador com maior variabilidade (SACKS *et al.*, 2011).

A seleção da HbA1c para triagem de DM em doadores de sangue apresenta três vantagens em relação à dosagem da glicemia: i) o jejum não interfere na dosagem de HbA1c; ii) as concentrações da HbA1c refletem a média glicêmica de 2 a 4 meses anteriores à coleta; e, iii) a HbA1c permite estratificar os indivíduos quanto ao risco em desenvolver complicações vasculares (DCCT, 1986; FULLERTON *et al.*, 2014; GARG *et al.*, 2014; ADA, 2015). Como contraponto, o ensaio laboratorial para a HbA1c é mais complexo e significativamente mais caro quando comparado a glicemia.

A proposta para o banco de sangue incorporar a triagem para o DM é controversa. É inegável o aumento de trabalho e custos deste serviço se implantada esta nova atividade. Entretanto, deve ser considerado que as hospitalizações associadas ao DM representam aproximadamente 7% dos gastos anuais com internações, como reportado em países desenvolvidos como os Estados Unidos (ROSA, R. S.; SCHMIDT, 2008), e, no Brasil, o panorama não é diferente. Só em 2011, o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou cerca de 65 milhões de reais com a hospitalização de pacientes diabéticos devido às complicações vasculares, que demandam procedimentos complexos de alto custo (BRASIL, 2014a). No Brasil, o custo médio por hospitalização decorrente de complicações do DM varia entre 1.302,00 a 1.315,00 reais (ROSA, R. *et al.*, 2014). O SUS paga 7,86 reais pela dosagem laboratorial de HbA1c (BRASIL, 2014b). Quando se compara os altos custos relativos a internações e tratamentos complementares associados ao diabetes, e pensando no alcance global dos objetivos das políticas de Saúde Pública no Brasil, a triagem da patologia vinculada aos bancos de sangue é viável (MENZIN *et al.*, 2010; LENZ *et al.*, 2014)

A avaliação do desempenho e do custo-efetividade da triagem de DM tem sido reportada em outros países, e mostrou-se viável, conveniente e acurada quando testes como a glicemia em jejum ou glicemia ao acaso foram empregados (LENHARD *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

O tamanho amostral, a falta de repetição dos ensaios e a impossibilidade de acompanhamento dos participantes (enquadrados como tendo DM ou daqueles com risco aumentado) para confirmação da estratificação apresentada, são limitações do experimento; bem como a falta de um estudo aprofundado de custo-efetividade da implantação da HbA1c em bancos de sangue. No entanto, ficou evidenciada a possibilidade de triagem do DM em hemocentros, os quais possuem estrutura e qualificação profissional para realizar este serviço.

Os dados desta análise foram submetidos à apreciação da *Revista Panamericana de Salud Pública* (Anexo 6) e aguardamos o parecer em relação ao aceite para publicação.

5.5.2 “Intervalo de referência para glicose ao acaso em doadores de sangue”

A glicemia em jejum é o principal teste laboratorial usado para triagem e diagnóstico de DM (SACKS *et al.*, 2011). Embora as concentrações de glicemia sem jejum apresentem uma maior variabilidade quando comparados com uma amostra de uma pessoa em jejum, a sua dosagem poderia fornecer informações interessantes para a triagem do DM. Uma limitação no uso de glicemia sem jejum é determinar os valores do intervalo de referência e de corte apropriado para este marcador.

Alguns estudos têm demonstrado que a determinação da glicemia em jejum ou glicemia ao acaso para triagem de DM em indivíduos saudáveis pode ser conveniente e acurado (LENHARD *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). Pessoas com risco aumentado para DM e pacientes com DM em fase inicial seriam os principais beneficiários de tal rastreio.

A partir das dosagens bioquímicas dos doadores de sangue saudáveis (grupo controle) foi possível determinar o intervalo de referência para glicemia sem jejum. Os dados desta análise foram submetidos à apreciação da *Revista Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Anexo 7) e aguardamos o parecer em relação ao aceite para publicação. Esta informação pode ser usada para estabelecer valores de corte para triagem de DM em bancos de sangue.

O intervalo de referência foi calculado de acordo com as Diretrizes do CSLI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), o Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (HOROWITZ *et al.*, 2008). Um indivíduo foi removido das análises

estatísticas por ter sido considerado “outlier” pelo teste de Tukey (glicemia = 165 mg/dL e HbA1c = 5,3%). Todas as análises foram realizadas com o programa MedCalc 12.2.1.0, e os valores se encontram na Tabela 26.

TABELA 26 – INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA GLICEMIA SEM JEJUM EM DOADORES DE SANGUE SAUDÁVEIS.

Gênero	Limite**, 95% IR	Não-paramétrico, mg/dL, (90% IC)	Método robusto, mg/dL, (90% IC)
Homens (n = 309)	Inferior	63,0 (60,0–69,0)	65,3 (63,4–67,4)
	Superior	138,5 (134,0–146,0)	135,6 (131,5–139,0)
Mulheres (n = 306)	Inferior	65,7 (60,0–67,0)	55,9 (52,7–59,1)
	Superior	132,3 (128,0–146,0)	125,3 (121,7–128,8)
Todos (n = 615)	Inferior	65,0 (62,0–67,0)	57,2 (54,9–59,3)
	Superior	136,2 (133,0–143,0)	127,7 (125,2–130,1)

IC: intervalo de confiança. IR: intervalo de referência. Cálculos de acordo com o CLSI C28-A3.

** Os limites são as concentrações inferiores (2,5%) e superiores (97,5%).

A média de idade dos participantes foi de 40 anos (intervalo interquartil, 29 – 47 anos) e o IMC foi 26,0 kg/m² (23 – 29 kg/m²), sem diferença significativa entre os gêneros ($P > 0,05$). A mediana da HbA1c dos doadores foi 5,3% (intervalo interquartil, 5,1 – 5,5%).

A glicemia sem jejum foi significativamente menor em mulheres do que em homens (90,5 mg/dL, intervalo interquartil, 80 – 103 mg/dL; e, 94 mg/dL, intervalo interquartil, 83 – 106 mg/dL, respectivamente. $P = 0,011$).

Um estudo conduzido na Índia sugeriu uma concentração de 70,2 mg/dL como limite inferior para o intervalo de referência da glicemia ao acaso. Eles encontraram concentrações entre 48 – 129 mg/dL para glicemia 1 hora após o café da manhã, e não foi encontrada diferença entre glicemia pós-prandial em relação ao gênero e a ingesta de carboidratos (SWAMINATHAN *et al.*, 2013). Outro estudo similar determinou o intervalo de referência para glicemia 2h pós-prandial em 10.665 indianos, e a mediana encontrada foi de 104 mg/dL (intervalo interquartil, 97 – 116 mg/dL), com coeficiente de variação de 14,5%.

Neste experimento, não controlamos o tempo de jejum tampouco a ingesta calórica antes da coleta de sangue, justamente para reproduzir a condição das amostras coletadas em banco de sangue (sem jejum). O intervalo de referência deste estudo é difícil de comparar com o dos estudos acima citados, principalmente

pela diferença no tamanho amostral. Além disso, neste estudo foram excluídos doadores que apresentaram concentrações de HbA1c maiores que 6,0% para minimizar a presença de DM não diagnosticado ou risco aumentado para DM.

O intervalo de referência proposto pelo método não paramétrico (95% IC) para glicemia sem jejum em doadores de sangue foi de 63–138,5 mg/dL para homens e 65,7–132,3 mg/dL para mulheres.

6 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos rs17576 do gene *MMP9* e rs3134945 do gene *RAGE* não estão associados ao diabetes tipo 1 e tipo 2 na população em estudo.
- Os polimorfismos rs1421085 do gene *FTO*, rs1137100 e rs1137101 do gene *LEPR*, rs1801282 do gene *PPAR γ* e rs7901695 do gene *TCF7L2* não estão associados ao diabetes gestacional.
- O polimorfismo rs780094 do gene *GCKR* foi associado ao diabetes gestacional na população estudada, nos modelos codominante e dominante ($P=0,022$ e $P=0,010$, respectivamente), sendo o alelo T protetor (*Odds ratio* 1,41; 95%IC 0,97-2,03).
- As frequências genotípicas e alélicas de todos os polimorfismos em estudo (rs17576, rs3134945, rs780094, rs1421085, rs1137100, rs1137101, rs1801282 e rs7901695) foram similares às de outras populações caucasianas.
- Os polimorfismos em estudo não apresentaram associação com aos parâmetros antropométricos, clínicos e laboratoriais estudados.
- As concentrações séricas das isoformas solúveis de RAGE (sRAGE e esRAGE) não diferem entre gêneros e não foram associadas ao DM2 ou aos polimorfismos rs17576 do gene *MMP9* e rs3134945 do gene *RAGE*.
- As concentrações séricas de sRAGE e esRAGE, respectivamente, apresentaram correlação positiva e significativa ($P<0,05$) com a glicemia ($r=0,335$; $r=0,320$) e com o 1,5 anidroglicitol ($r=0,446$ e $r=0,563$).

REFERÊNCIAS

- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 33 Suppl 1, p. S62-9. 2010.
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 35 Suppl 1, p. S64-71. 2012.
- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 37 Suppl 1, p. S81-90. 2014.
- ADA. Classification and diagnosis of diabetes. American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 38(Suppl. 1), p. 8. 2015.
- ADA. Cardiovascular Disease and Risk Management. **Diabetes Care**. v. 38, n.Suppl 1, p. 9. 2015a.
- AGARWAL, M. M.; DHATT, G. S.; OTHMAN, Y. Gestational diabetes: differences between the current international diagnostic criteria and implications of switching to IADPSG. **J Diabetes Complications**. v. 29, n.4, p. 544-9. 2015.
- AHLUWALIA, T. S. *et al.* Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians. **Plos One**. v. 4, n.4, p. e5168. 2009.
- AHLZEN, M. *et al.* Expression of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) in human adipocytes is down regulated by insulin. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 370, n.1, p. 49-52. 2008.
- AHSAN, H. Diabetic retinopathy--biomolecules and multiple pathophysiology. **Diabetes Metab Syndr**. v. 9, n.1, p. 51-4. 2015.
- AL-RUBEAN, K. *et al.* Diabetic foot complications and their risk factors from a large retrospective cohort study. **Plos One**. v. 10, n.5, p. e0124446. 2015.
- AL SIFRI, S. N. *et al.* Results of the Dyslipidemia International Study (DYSIS)-Middle East: clinical perspective on the prevalence and characteristics of lipid abnormalities in the setting of chronic statin treatment. **Plos One**. v. 9, n.1, p. e84350. 2014.
- ALBUQUERQUE, D.; NOBREGA, C.; MANCO, L. Association of FTO polymorphisms with obesity and obesity-related outcomes in Portuguese children. **Plos One**. v. 8, n.1, p. e54370. 2013.
- ALEJANDRO, E. U. *et al.* Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. **Mol Aspects Med**. v. 42, p. 19-41. 2015.
- ALIZADEH, B. Z.; KOELEMAN, B. P. Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. **Clin Chim Acta**. v. 387, n.1-2, p. 9-17. 2008.
- ANGHEBEM-OLIVEIRA, M. I. *et al.* RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. **J Bras Patol Med Lab**. v. 49, n.2, p. 12. 2013.
- ANIK, A. *et al.* Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. **J Pediatr Endocrinol Metab**. v. 28, n.3-4, p. 251-63. 2015.

ARABI, Y. M. *et al.* sRAGE in diabetic and non-diabetic critically ill patients: effects of intensive insulin therapy. **Crit Care**. v. 15, n.4, p. R203. 2011.

ARDEN, C. *et al.* Glucokinase Is an Integral Component of the Insulin Granules in Glucose-Responsive Insulin Secretory Cells and Does Not Translocate During Glucose Stimulation. **Diabetes**. v. 53, p. 2346-2352. 2004.

ATHYROS, V. G.; MIKHAILIDIS, D. P. Uric acid, chronic kidney disease and type 2 diabetes: a cluster of vascular risk factors. **J Diabetes Complications**. v. 28, n.2, p. 122-3. 2014.

AUWERX, J. Nuclear receptors. I. PPAR gamma in the gastrointestinal tract: gain or pain? **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**. v. 282, n.4, p. G581-5. 2002.

BALDWIN, W. *et al.* Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. **Diabetes**. v. 60, n.4, p. 1258-69. 2011.

BALSELLS, M. *et al.* Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **BMJ**. v. 350, p. h102. 2015.

BASILE, K. J. *et al.* Overlap of genetic susceptibility to type 1 diabetes, type 2 diabetes, and latent autoimmune diabetes in adults. **Curr Diab Rep**. v. 14, n.11, p. 550. 2014.

BATTAGLIA, M. Neutrophils and type 1 autoimmune diabetes. **Curr Opin Hematol**. v. 21, n.1, p. 8-15. 2014.

BELO, V. A. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 genetic variations affect MMP-9 levels in obese children. **Int J Obes (Lond)**. v. 36, n.1, p. 69-75. 2012.

BENDER, N. *et al.* Association between variants of the leptin receptor gene (LEPR) and overweight: a systematic review and an analysis of the CoLaus study. **Plos One**. v. 6, n.10, p. e26157. 2011.

BHATTARAI, M. D. Three patterns of rising type 2 diabetes prevalence in the world: need to widen the concept of prevention in individuals into control in the community. **JNMA J Nepal Med Assoc**. v. 48, n.174, p. 173-9. 2009.

BLANKENBERG, S. *et al.* Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. **Circulation**. v. 107, n.12, p. 1579-85. 2003.

BO, S. *et al.* Associations between serum uric acid and adipokines, markers of inflammation, and endothelial dysfunction. **J Endocrinol Invest**. v. 31, n.6, p. 499-504. 2008.

BONAKDARAN, S.; KHARAQANI, B. Association of serum uric acid and metabolic syndrome in type 2 diabetes. **Curr Diabetes Rev**. v. 10, n.2, p. 113-7. 2014.

BORITZA, K. C. *et al.* 1,5 Anhydroglucitol serum concentration as a biomarker for screening gestational diabetes in early pregnancy. **Clin Chem Lab Med**. v. 52, n.8, p. e179-81. 2014.

BORNFELDT, K. E.; TABAS, I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. **Cell Metab**. v. 14, n.5, p. 575-85. 2011.

BOS, D. C.; DE RANITZ-GREVEN, W. L.; DE VALK, H. W. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. **Diabetes Technol Ther.** v. 13, n.7, p. 773-9. 2011.

BOSO, M. *et al.* Alterations of circulating endogenous secretory RAGE and S100A9 levels indicating dysfunction of the AGE-RAGE axis in autism. **Neuroscience Letters.** v. 410, n.3, p. 169-73. 2006.

BRASIL. **DATASUS. Indicadores e Dados Básicos – IDB. 2012.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabnet.exe?idb2012/g01.def>>. Acesso em: 06 nov 2014.

BRASIL. **Portaria No 2.712, de 12 de novembro de 2013.** Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt2712_12_11_2013.html>. Acesso em: 14 nov 2014.

BRASIL. **VIGITEL - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico 2013. Dados sobre Diabetes.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04-ok.pdf>>. Acesso em: 11 nov 2014.

BRASIL. **DATASUS. Procedimentos hospitalares do SUS.** Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>>. Acesso em: 11 nov 2014.

BRASIL. **DATASUS. Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS.** Disponível em: <<http://sigtap.datasus.gov.br/tabela-unificada/app/sec/procedimento/exibir/0202010503/11/2014>>. Acesso em: 17 nov 2014.

BRESSLER, J. *et al.* Risk of type 2 diabetes and obesity is differentially associated with variation in FTO in whites and African-Americans in the ARIC study. **PLoS One.** v. 5, n.5, p. e10521. 2010.

BRETT, J. *et al.* Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **American Journal of Pathology.** v. 143, n.6, p. 1699-712. 1993.

BRETT, J. *et al.* Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **Am J Pathol.** v. 143, n.6, p. 1699-712. 1993.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature.** v. 414, n.6865, p. 813-20. 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes.** v. 54, n.6, p. 1615-25. 2005.

BRUNETTI, A.; CHIEFARI, E.; FOTI, D. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. **World J Diabetes.** v. 5, n.2, p. 128-40. 2014.

BUCCIARELLI, L. G. *et al.* RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. **Circulation.** v. 106, n.22, p. 2827-35. 2002.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H.; PAGE, K. A. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. **Nat Rev Endocrinol.** v. 8, n.11, p. 639-49. 2012.

BURTIS, C. A. *et al.* **Tietz fundamentals of clinical chemistry.** 5th. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.

CAMMISOTTO, P.; BENDAYAN, M. A review on gastric leptin: the exocrine secretion of a gastric hormone. **Anat Cell Biol.** v. 45, n.1, p. 1-16. 2012.

CANTO, J. G. *et al.* Number of coronary heart disease risk factors and mortality in patients with first myocardial infarction. **JAMA.** v. 306, n.19, p. 2120-7. 2011.

CATALANO, M. *et al.* The Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with plasma levels of soluble RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) and the presence of peripheral arterial disease. **Clin Biochem.** v. 41, n.12, p. 981-5. 2008.

CAUCHI, S. *et al.* TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. **J Mol Med (Berl).** v. 85, n.7, p. 777-82. 2007.

CHA, S. W. *et al.* Replication of genetic effects of FTO polymorphisms on BMI in a Korean population. **Obesity (Silver Spring).** v. 16, n.9, p. 2187-9. 2008.

CHANDAK, G. R. *et al.* Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. **Diabetologia.** v. 50, n.1, p. 63-7. 2007.

CHAUHAN, G. *et al.* Common variants of FTO and the risk of obesity and type 2 diabetes in Indians. **J Hum Genet.** v. 56, n.10, p. 720-6. 2011.

CHEHADE, J. M.; GLADYSZ, M.; MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. **Drugs.** v. 73, n.4, p. 327-39. 2013.

CHEN, H. Y. *et al.* The impact of cardiac and noncardiac comorbidities on the short-term outcomes of patients hospitalized with acute myocardial infarction: a population-based perspective. **Clin Epidemiol.** v. 5, p. 439-48. 2013.

CHENG, C. *et al.* Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. **Mod Pathol.** v. 18, n.10, p. 1385-96. 2005.

CHENG, Y. *et al.* [Genotype discrepancy between maternal and fetal Pro12Ala polymorphism of PPARG2 gene and its association with gestational diabetes mellitus]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.** v. 45, n.3, p. 170-3. 2010.

CHEUNG, M. K.; YEO, G. S. FTO Biology and Obesity: Why Do a Billion of Us Weigh 3 kg More? **Front Endocrinol (Lausanne).** v. 2, p. 4. 2011.

CHO, Y. M. *et al.* Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. **Diabetologia.** v. 52, n.2, p. 253-61. 2009.

CHOI, K. M. *et al.* Association between endogenous secretory RAGE, inflammatory markers and arterial stiffness. **Int J Cardiol.** v. 132, n.1, p. 96-101. 2009.

CHOI, Y. J. *et al.* Uric acid induces endothelial dysfunction by vascular insulin resistance associated with the impairment of nitric oxide synthesis. **FASEB J.** v. 28, n.7, p. 3197-204. 2014.

CHON, S. J. *et al.* Association of variants in PPARGgamma(2), IGF2BP2, and KCNQ1 with a susceptibility to gestational diabetes mellitus in a Korean population. **Yonsei Med J.** v. 54, n.2, p. 352-7. 2013.

CHOWDHURY, S. Puberty and type 1 diabetes. **Indian J Endocrinol Metab.** v. 19, n.Supp 1, p. S51-4. 2015.

CHU, S. Y. *et al.* Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 30, n.8, p. 2070-6. 2007.

CHUAH, Y. K. *et al.* Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. **Int J Inflam.** v. 2013, p. 403460. 2013.

CICCACCI, C. *et al.* TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes: association with diabetic retinopathy and cardiovascular autonomic neuropathy. **Acta Diabetol.** v. 50, n.5, p. 789-99. 2013.

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell.** v. 127, n.3, p. 469-80. 2006.

COLHOUN, H. M. *et al.* Total soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products as predictive biomarkers of coronary heart disease risk in patients with type 2 diabetes: an analysis from the CARDS trial. **Diabetes.** v. 60, n.9, p. 2379-85. 2011.

CONSTANTIN, A. *et al.* Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 391, n.1, p. 282-6. 2010.

CONWAY, B. *et al.* Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes. **Diabet Med.** v. 27, n.4, p. 398-404. 2010.

COUTINHO TDE, A. *et al.* Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome, and subclinical coronary atherosclerosis. **Am J Hypertens.** v. 20, n.1, p. 83-9. 2007.

CREAGH-BROWN, B. C. *et al.* The RAGE axis in systemic inflammation, acute lung injury and myocardial dysfunction: an important therapeutic target? **Intensive Care Med.** v. 36, n.10, p. 1644-56. 2010.

CREATORE, M. I. *et al.* Age- and sex-related prevalence of diabetes mellitus among immigrants to Ontario, Canada. **CMAJ.** v. 182, n.8, p. 781-9. 2010.

CUNDY, T. Proposed new diagnostic criteria for gestational diabetes--a pause for thought? **Diabet Med.** v. 29, n.2, p. 176-80. 2012.

CURRAN, C. S.; BERTICS, P. J. Human eosinophils express RAGE, produce RAGE ligands, exhibit PKC-delta phosphorylation and enhanced viability in response to the RAGE ligand, S100B. **Int Immunol.** v. 23, n.12, p. 713-28. 2011.

DCCT. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Design and methodologic considerations for the feasibility phase. The DCCT Research Group. **Diabetes.** v. 35, n.5, p. 530-45. 1986.

DE LA IGLESIA, N. *et al.* Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. **FEBS Letters.** v. 456, n.2, p. 332-338. 1999.

DEEB, S. S. *et al.* A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nat Genet.** v. 20, n.3, p. 284-7. 1998.

DELANEY, S. S.; COLEY, R. Y.; BROWN, Z. 1,5-Anhydroglucitol: a new predictor of neonatal birth weight in diabetic pregnancies. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 189, p. 55-8. 2015.

DEMLING, N. *et al.* Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. **Cell Tissue Res.** v. 323, n.3, p. 475-88. 2006.

DEROSA, G. *et al.* Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. **Diabetes Metab.** v. 33, n.2, p. 129-34. 2007.

DETTORAKI, A.; GIL, A. P.; SPILIOTIS, B. E. Association between serum levels of the soluble receptor (sRAGE) for advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in peripheral blood mononuclear cells of children with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 22, n.10, p. 895-904. 2009.

DI CIANNI, G. *et al.* Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. **Diabetes/metabolism research and reviews.** v. 19, n.4, p. 259-70. 2003.

DINA, C. *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. **Nat Genet.** v. 39, n.6, p. 724-6. 2007.

DING, Q.; KELLER, J. N. Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. **Biochim Biophys Acta.** v. 1746, n.1, p. 18-27. 2005.

DING, Q.; KELLER, J. N. Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. **Neurosci Lett.** v. 373, n.1, p. 67-72. 2005.

DIXIT, S.; MAIYA, A. Diabetic peripheral neuropathy and its evaluation in a clinical scenario: a review. **J Postgrad Med.** v. 60, n.1, p. 33-40. 2014.

DONEY, A. S. *et al.* The FTO gene is associated with an atherogenic lipid profile and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: a Genetics of Diabetes Audit and Research Study in Tayside Scotland (Go-DARTS) study. **Circ Cardiovasc Genet.** v. 2, n.3, p. 255-9. 2009.

DONEY, A. S. *et al.* Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. **Diabetologia.** v. 47, n.3, p. 555-8. 2004.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Rev Mol Diagn.** v. 8, n.1, p. 9-19. 2008.

DURAN RODRIGUEZ-HERVADA, A.; CALLE PASCUAL, A. L. Diagnostic criteria for gestational diabetes: The debate goes on diagnosis of gestational diabetes. **Endocrinol Nutr.** v. p. 2015.

DURPES, M. C. *et al.* PKC-beta activation inhibits IL-18-binding protein causing endothelial dysfunction and diabetic atherosclerosis. **Cardiovasc Res.** v. 106, n.2, p. 303-13. 2015.

EISENBARTH, G. S. *et al.* Restoration of first phase insulin secretion by daily prednisone in two islet cell antibody positive nondiabetic individuals. **Transplant Proc.** v. 18, p. 4. 1986.

ETEMAD, A. *et al.* Analysis of Gln223Arg polymorphism of Leptin Receptor Gene in type II diabetic mellitus subjects among Malaysians. **Int J Mol Sci.** v. 14, n.9, p. 19230-44. 2013.

EZE, I. C. *et al.* Environmental tobacco smoke exposure and diabetes in adult never-smokers. **Environ Health.** v. 13, p. 74. 2014.

FAJAS, L. *et al.* The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. **J Biol Chem.** v. 272, n.30, p. 18779-89. 1997.

FALCONE, C. *et al.* Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 25, n.5, p. 1032-7. 2005.

FIELD, S. F. *et al.* Analysis of the obesity gene FTO in 14,803 type 1 diabetes cases and controls. **Diabetologia.** v. 50, n.10, p. 2218-20. 2007.

FLEMING, T. H. *et al.* Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini-review. **Gerontology.** v. 57, n.5, p. 435-43. 2011.

FLORES LE-ROUX, J. A.; BENAIGES BOIX, D.; PEDRO-BOTET, J. [Gestational diabetes mellitus: importance of blood glucose monitoring]. **Clin Investig Arterioscler.** v. 25, n.4, p. 175-81. 2013.

FONG, F. M. *et al.* Maternal genotype and severe preeclampsia: a HuGE review. **Am J Epidemiol.** v. 180, n.4, p. 335-45. 2014.

FRAYLING, T. M. *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science.** v. 316, n.5826, p. 889-94. 2007.

FREATHY, R. M. *et al.* Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: common genetic variants in GCK and TCF7L2 are associated with fasting and postchallenge glucose levels in pregnancy and with the new consensus definition of gestational diabetes mellitus from the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. **Diabetes.** v. 59, n.10, p. 2682-9. 2010.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.** v. 18, n.6, p. 499-502. 1972.

FULLERTON, B. *et al.* Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 2, p. CD009122. 2014.

GAENS, K. H. *et al.* Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 94, n.12, p. 5174-80. 2009.

GAENS, K. H. *et al.* Receptor for advanced glycation end product polymorphisms and type 2 diabetes: the CODAM study. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1126, p. 162-5. 2008.

GARG, N. *et al.* Hemoglobin A(1c) in nondiabetic patients: an independent predictor of coronary artery disease and its severity. **Mayo Clin Proc.** v. 89, n.7, p. 908-16. 2014.

GERKEN, T. *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. **Science**. v. 318, n.5855, p. 1469-72. 2007.

GEROLDI, D.; FALCONE, C.; EMANUELE, E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. **Curr Med Chem**. v. 13, n.17, p. 1971-8. 2006.

GIANNINI, C. *et al.* The possible role of esRAGE and sRAGE in the natural history of diabetic nephropathy in childhood. **Pediatr Nephrol**. v. 27, n.2, p. 269-75. 2012.

GINTER, E.; SIMKO, V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. **Adv Exp Med Biol**. v. 771, p. 42-50. 2012.

GOHDA, T. *et al.* Increased serum endogenous secretory receptor for advanced glycation end-product (esRAGE) levels in type 2 diabetic patients with decreased renal function. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 81, n.2, p. 196-201. 2008.

GOLDFARB, M. F. Relation of time of introduction of cow milk protein to an infant and risk of type-1 diabetes mellitus. **J Proteome Res**. v. 7, n.5, p. 2165-7. 2008.

GOOVA, M. T. *et al.* Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. **American Journal of Pathology**. v. 159, n.2, p. 513-25. 2001.

GOTODA, T. *et al.* Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. **Hum Mol Genet**. v. 6, n.6, p. 869-76. 1997.

GRANADA, C. *et al.* Can overt diabetes mellitus be predicted by an early A1C value in gestational diabetics? **J Reprod Med**. v. 59, n.7-8, p. 343-7. 2014.

GRANT, S. F. *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. **Nat Genet**. v. 38, n.3, p. 320-3. 2006.

GREVEN, W. L. *et al.* Glycemic variability in inadequately controlled type 1 diabetes and type 2 diabetes on intensive insulin therapy: a cross-sectional, observational study. **Diabetes Technol Ther**. v. 12, n.9, p. 695-9. 2010.

GRIZ, L. H. *et al.* Vitamin D and diabetes mellitus: an update 2013. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 58, n.1, p. 1-8. 2014.

GROOP, L.; POCIOT, F. Genetics of diabetes--are we missing the genes or the disease? **Mol Cell Endocrinol**. v. 382, n.1, p. 726-39. 2014.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 46, n.1, p. 16-26. 2002.

GROVES, C. J. *et al.* Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. **Diabetes**. v. 55, n.9, p. 2640-4. 2006.

GU, H. *et al.* Gly82Ser polymorphism of the receptor for advanced glycation end products is associated with an increased risk of gastric cancer in a Chinese population. **Clinical Cancer Research**. v. 14, n.11, p. 3627-32. 2008.

GULATI, P. *et al.* Fat mass and obesity-related (FTO) shuttles between the nucleus and cytoplasm. **Biosci Rep.** v. 34, n.5, p. 2014.

GULATI, P.; YEO, G. S. The biology of FTO: from nucleic acid demethylase to amino acid sensor. **Diabetologia.** v. 56, n.10, p. 2113-21. 2013.

HAAK, T. Combination of linagliptin and metformin for the treatment of patients with type 2 diabetes. **Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.** v. 8, p. 1-6. 2015.

HAMED, S.; BRENNER, B.; ROGUIN, A. Nitric oxide: a key factor behind the dysfunctionality of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus type-2. **Cardiovasc Res.** v. 91, n.1, p. 9-15. 2011.

HAN, Z. *et al.* Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. **Nature.** v. 464, n.7292, p. 1205-9. 2010.

HANCOCK, D. B. *et al.* Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. **Nat Genet.** v. 42, n.1, p. 45-52. 2010.

HANFORD, L. E. *et al.* Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). **J Biol Chem.** v. 279, n.48, p. 50019-24. 2004.

HANSEN, S. K. *et al.* Analysis of separate and combined effects of common variation in KCNJ11 and PPARG on risk of type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 90, n.6, p. 3629-37. 2005.

HARA, K. *et al.* The Pro12Ala polymorphism in PPAR gamma2 may confer resistance to type 2 diabetes. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 271, n.1, p. 212-6. 2000.

HARBRON, J. *et al.* Fat mass and obesity-associated (FTO) gene polymorphisms are associated with physical activity, food intake, eating behaviors, psychological health, and modeled change in body mass index in overweight/obese Caucasian adults. **Nutrients.** v. 6, n.8, p. 3130-52. 2014.

HARJA, E. *et al.* Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. **Journal of Clinical Investigation.** v. 118, n.1, p. 183-94. 2008.

HAYASHINO, Y. *et al.* Serum high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with high risk of development, not progression, of diabetic nephropathy among Japanese type 2 diabetic patients: a prospective cohort study (Diabetes Distress and Care Registry at Tenri [DDCRT7]). **Diabetes Care.** v. 37, n.11, p. 2947-52. 2014.

HAYWARD, B. E. *et al.* Organization of the human glucokinase regulator gene GCKR. **Genomics.** v. 49, n.1, p. 137-42. 1998.

HENRIQUES, J. *et al.* [Diabetic eye disease]. **Acta Med Port.** v. 28, n.1, p. 107-13. 2015.

HEREDIA, V. V. *et al.* Biochemical basis of glucokinase activation and the regulation by glucokinase regulatory protein in naturally occurring mutations. **J Biol Chem.** v. 281, n.52, p. 40201-7. 2006.

HERNANDEZ, C. *et al.* Prevalence and risk factors accounting for true silent myocardial ischemia: a pilot case-control study comparing type 2 diabetic with non-diabetic control subjects. **Cardiovasc Diabetol.** v. 10, p. 9. 2011.

HEUDE, B. *et al.* Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARgamma and their haplotypes with susceptibility to gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 96, n.10, p. E1656-60. 2011.

HISHIDA, A. *et al.* Associations of apolipoprotein A5 (APOA5), glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) polymorphisms and lifestyle factors with the risk of dyslipidemia and dysglycemia in Japanese - a cross-sectional data from the J-MICC Study. **Endocrine Journal.** v. 59, n.7, p. 589-99. 2012.

HORI, O. *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. **J Biol Chem.** v. 270, n.43, p. 25752-61. 1995.

HOROWITZ, G. *et al.* **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) C28-A3: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory.** 3rd. Clinical Laboratory and Standards Institute, 2008.

HSUEH, W. A.; LAW, R. E. PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 21, n.12, p. 1891-5. 2001.

HU, Z. *et al.* Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. **Clinical Cancer Research.** v. 11, n.15, p. 5433-9. 2005.

HUDSON, B. I. *et al.* Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. **FASEB J.** v. 22, n.5, p. 1572-80. 2008b.

HUDSON, B. I. *et al.* Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. **Diabetes.** v. 50, n.6, p. 1505-11. 2001.

HUERTA-CHAGOYA, A. *et al.* Genetic determinants for gestational diabetes mellitus and related metabolic traits in mexican women. **PLoS One.** v. 10, n.5, p. e0126408. 2015.

HUMPHRIES, S. E. *et al.* Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. **J Mol Med (Berl).** v. 84, n.12, p. 1005-14. 2006.

HUOPIO, H. *et al.* Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. **Eur J Endocrinol.** v. 169, n.3, p. 291-7. 2013.

HUTTUNEN, H. J.; FAGES, C.; RAUVALA, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. **J Biol Chem.** v. 274, n.28, p. 19919-24. 1999.

IACOBINI, C. *et al.* Advanced lipoxidation end-products mediate lipid-induced glomerular injury: role of receptor-mediated mechanisms. **Journal of Pathology.** v. 218, n.3, p. 360-9. 2009.

IDF. **International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas.** Disponível em: <http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf>. Acesso em: 20 set 2013.

IP, W.; CHIANG, Y. T.; JIN, T. The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. **Cell Biosci.** v. 2, n.1, p. 28. 2012.

IP, W. *et al.* The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 is upregulated by insulin and represses hepatic gluconeogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 303, n.9, p. E1166-76. 2012.

ISLAM, S. T.; SRINIVASAN, S.; CRAIG, M. E. Environmental determinants of type 1 diabetes: a role for overweight and insulin resistance. **J Paediatr Child Health.** v. 50, n.11, p. 874-9. 2014.

IYNEDJIAN, P. B. Mammalian glucokinase and its gene. **Biochem J.** v. 293 (Pt 1), p. 1-13. 1993.

JACQUEMINET, S. *et al.* Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in type 1 diabetic patients with and without retinopathy. **Clin Chim Acta.** v. 367, n.1-2, p. 103-7. 2006.

JANANI, C.; RANJITHA KUMARI, B. D. PPAR gamma gene--a review. **Diabetes Metab Syndr.** v. 9, n.1, p. 46-50. 2015.

JANUSZEWSKI, A. S. *et al.* Plasma 1,5 anhydroglucitol levels, a measure of short-term glycaemia: assay assessment and lower levels in diabetic vs. non-diabetic subjects. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 95, n.1, p. e17-9. 2012.

JAX, T. W. Metabolic memory: a vascular perspective. **Cardiovasc Diabetol.** v. 9, p. 51. 2010.

JEONG, I. K.; KING, G. L. New perspectives on diabetic vascular complications: the loss of endogenous protective factors induced by hyperglycemia. **Diabetes Metab J.** v. 35, n.1, p. 8-11. 2011.

Jl, H. *et al.* Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis. **J Exp Med.** v. 194, n.3, p. 321-30. 2001.

JIAO, L. *et al.* Advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products, and risk of colorectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 20, n.7, p. 1430-8. 2011.

JIAO, L. *et al.* Evidence that serum levels of the soluble receptor for advanced glycation end products are inversely associated with pancreatic cancer risk: a prospective study. **Cancer Res.** v. 71, n.10, p. 3582-9. 2011.

JIN, L. *et al.* Role of glucokinase in the subcellular localization of glucokinase regulatory protein. **Int J Mol Sci.** v. 16, n.4, p. 7377-93. 2015.

JIN, T.; LIU, L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. **Mol Endocrinol.** v. 22, n.11, p. 2383-92. 2008.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **Lancet.** v. 383, n.9922, p. 1068-83. 2014.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature.** v. 444, n.7121, p. 840-6. 2006.

KAJIKAWA, M. *et al.* Ratio of serum levels of AGEs to soluble form of RAGE is a predictor of endothelial function. **Diabetes Care**. v. 38, n.1, p. 119-25. 2015.

KALEA, A. Z.; SCHMIDT, A. M.; HUDSON, B. I. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. **Clin Sci (Lond)**. v. 116, n.8, p. 621-37. 2009.

KALOUSOVA, M. *et al.* Genetic predisposition to advanced glycation end products toxicity is related to prognosis of chronic hemodialysis patients. **Kidney Blood Press Res**. v. 33, n.1, p. 30-6. 2010.

KANAYA, A. M. *et al.* Understanding the high prevalence of diabetes in U.S. south Asians compared with four racial/ethnic groups: the MASALA and MESA studies. **Diabetes Care**. v. 37, n.6, p. 1621-8. 2014.

KANELIS, J.; KANG, D. H. Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. **Semin Nephrol**. v. 25, n.1, p. 39-42. 2005.

KATAKAMI, N. *et al.* Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients. **Diab Vasc Dis Res**. v. 5, n.3, p. 190-7. 2008.

KATON, J. *et al.* Hemoglobin A1c and postpartum abnormal glucose tolerance among women with gestational diabetes mellitus. **Obstet Gynecol**. v. 119, n.3, p. 566-74. 2012.

KATSIKI, N. *et al.* Uric acid and diabetes: Is there a link? **Curr Pharm Des**. v. 19, n.27, p. 4930-7. 2013.

KISLINGER, T. *et al.* N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. **J Biol Chem**. v. 274, n.44, p. 31740-9. 1999.

KNIP, M. *et al.* Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 54 Suppl 2, p. S125-36. 2005.

KONES, R.; RUMANA, U. Prevention of cardiovascular disease: updating the immensity of the challenge and the role of risk factors. **Hosp Pract (1995)**. v. 42, n.1, p. 92-100. 2014.

KOYAMA, H. *et al.* Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 25, n.12, p. 2587-93. 2005.

KRECHLER, T. *et al.* Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreas cancer. **Clin Biochem**. v. 43, n.10-11, p. 882-6. 2010.

KRUZLIAK, P. *et al.* Polymorphisms of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma (rs1801282) and its coactivator-1 (rs8192673) are associated with obesity indexes in subjects with type 2 diabetes mellitus. **Cardiovasc Diabetol**. v. 14, n.1, p. 42. 2015.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**. v. 19, n.19, p. 5444. 1991.

LAMBRINOUDAKI, I.; VLACHOU, S. A.; CREATSAS, G. Genetics in gestational diabetes mellitus: association with incidence, severity, pregnancy outcome and response to treatment. **Curr Diabetes Rev.** v. 6, n.6, p. 393-9. 2010.

LAMMERT, A. *et al.* Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 283, n.4, p. 982-8. 2001.

LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging.** v. 22, n.6, p. 937-44. 2001.

LARDER, R. *et al.* Where to go with FTO? **Trends Endocrinol Metab.** v. 22, n.2, p. 53-9. 2011.

LAUENBORG, J. *et al.* Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 94, n.1, p. 145-50. 2009.

LAUGHON, S. K. *et al.* Elevated first-trimester uric acid concentrations are associated with the development of gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol.** v. 201, n.4, p. 402 e1-5. 2009.

LAUGHON, S. K.; CATOV, J.; ROBERTS, J. M. Uric acid concentrations are associated with insulin resistance and birthweight in normotensive pregnant women. **Am J Obstet Gynecol.** v. 201, n.6, p. 582 e1-6. 2009.

LEE, J. *et al.* Influence of maternal environmental tobacco smoke exposure assessed by hair nicotine levels on birth weight. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 16, n.7, p. 3029-34. 2015.

LEGRY, V. *et al.* Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. **Metabolism.** v. 58, n.7, p. 971-5. 2009.

LENHARD, M. J. *et al.* Screening blood donors for diabetes: analysis of use, accuracy, and cost. **Transfusion.** v. 53, n.11, p. 2776-81. 2013.

LENZ, R. *et al.* [Levels of glycosylated hemoglobin and the difference in the cost of health care for diabetic patients: an econometric study]. **Rev Med Chil.** v. 142, n.7, p. 841-9. 2014.

LEVY, A. *et al.* Family history of diabetes mellitus as an independent risk factor for macrosomia and cesarean delivery. **J Matern Fetal Neonatal Med.** v. 23, n.2, p. 148-52. 2010.

LEWIS, J. D. *et al.* An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. **The American journal of gastroenterology.** v. 96, n.12, p. 3323-8. 2001.

LI, K. *et al.* A functional p.82G>S polymorphism in the RAGE gene is associated with multiple sclerosis in the Chinese population. **Multiple Sclerosis.** v. 17, n.8, p. 914-21. 2011.

LI, Y. *et al.* Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR-alpha/-gamma activator properties. **Diabetes Obes Metab.** v. 10, n.1, p. 10-7. 2008.

LIM, A. Diabetic nephropathy - complications and treatment. **Int J Nephrol Renovasc Dis.** v. 7, p. 361-81. 2014.

LIND, M.; SVENSSON, A. M.; ROSENGREN, A. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. **N Engl J Med.** v. 372, n.9, p. 880-1. 2015.

LINDHEIMER, M. D.; TALER, S. J.; CUNNINGHAM, F. G. Hypertension in pregnancy. **J Am Soc Hypertens**. v. 2, n.6, p. 484-94. 2008.

LINDSEY, J. B. *et al.* Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. **Diab Vasc Dis Res**. v. 6, n.1, p. 7-14. 2009.

LING, Y. *et al.* Associations of common polymorphisms in GCKR with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population: a case-control study. **BMC Med Genet**. v. 12, p. 66. 2011.

LOGUE, J.; WILD, S.; SATTAR, N. BMI and mortality among adults with incident type 2 diabetes. **N Engl J Med**. v. 370, n.14, p. 1362. 2014.

LONG, A. N.; DAGOGO-JACK, S. Comorbidities of diabetes and hypertension: mechanisms and approach to target organ protection. **J Clin Hypertens (Greenwich)**. v. 13, n.4, p. 244-51. 2011.

LU, L. *et al.* Increased glycated albumin and decreased esRAGE concentrations are associated with in-stent restenosis in Chinese diabetic patients. **Clin Chim Acta**. v. 396, n.1-2, p. 33-7. 2008.

LU, W.; FENG, B. The -374A allele of the RAGE gene as a potential protective factor for vascular complications in type 2 diabetes: a meta-analysis. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v. 220, n.4, p. 291-7. 2010.

LYSSENKO, V. *et al.* Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. **J Clin Invest**. v. 117, n.8, p. 2155-63. 2007.

MACISAAC, R. J.; EKINCI, E. I.; JERUMS, G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. **Am J Kidney Dis**. v. 63, n.2 Suppl 2, p. S39-62. 2014.

MAILLARD-LEFEBVRE, H. *et al.* Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. **Rheumatology (Oxford)**. v. 48, n.10, p. 1190-6. 2009.

MALHERBE, P. *et al.* cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. **Brain Res Mol Brain Res**. v. 71, n.2, p. 159-70. 1999.

MARCOVECCHIO, M. L.; LUCANTONI, M.; CHIARELLI, F. Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications. **Diabetes Technol Ther**. v. 13, n.3, p. 389-94. 2011.

MARSEILLE-TREMBLAY, C. *et al.* Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. **Mol Reprod Dev**. v. 75, n.6, p. 1054-62. 2008.

MARTIN, K. E. *et al.* The influence of maternal BMI and gestational diabetes on pregnancy outcome. **Diabetes Res Clin Pract**. v. p. 2015.

MASUD, S.; YE, S.; GROUP, S. A. S. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. **J Med Genet.** v. 40, n.10, p. 773-80. 2003.

MATSCHINSKY, F. M. *et al.* The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. **Diabetes.** v. 55, n.1, p. 1-12. 2006.

MATTEVI, V. S.; ZEMBRZUSKI, V. M.; HUTZ, M. H. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v. 40, n.7, p. 927-32. 2007.

MAYANS, S. *et al.* TCF7L2 polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern Sweden. **Eur J Hum Genet.** v. 15, n.3, p. 342-6. 2007.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Curr Opin Cell Biol.** v. 13, n.5, p. 534-40. 2001.

MEIRHAEGHE, A.; AMOUYEL, P. Impact of genetic variation of PPARGgamma in humans. **Mol Genet Metab.** v. 83, n.1-2, p. 93-102. 2004.

MEIRHAEGHE, A. *et al.* A possible role for the PPARG Pro12Ala polymorphism in preterm birth. **Diabetes.** v. 56, n.2, p. 494-8. 2007.

MEIRHAEGHE, A. *et al.* A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPARG gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 23, n.2, p. 289-94. 2003.

MEIRHAEGHE, A. *et al.* A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. **Hum Mol Genet.** v. 7, n.3, p. 435-40. 1998.

MENZIN, J. *et al.* Relationship between glycemic control and diabetes-related hospital costs in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. **J Manag Care Pharm.** v. 16, n.4, p. 264-75. 2010.

MERKESTEIN, M. *et al.* FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. **Nat Commun.** v. 6, p. 6792. 2015.

METZ, V. V. *et al.* Induction of RAGE shedding by activation of G protein-coupled receptors. **Plos One.** v. 7, n.7, p. e41823. 2012.

METZGER, B. E. *et al.* International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care.** v. 33, n.3, p. 676-82. 2010.

METZGER, I. F. *et al.* Genetic variants in matrix metalloproteinase-9 gene modify metalloproteinase-9 levels in black subjects. **DNA Cell Biol.** v. 31, n.4, p. 504-10. 2012.

MIYAZAWA, T. *et al.* Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis. **Amino Acids.** v. 42, n.4, p. 1163-70. 2012.

MORRIS, A. P. *et al.* Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. **Nat Genet.** v. 44, n.9, p. 981-90. 2012.

MURATA-MORI, F. *et al.* Association of the GCKR rs780094 polymorphism with metabolic traits including carotid intima-media thickness in Japanese community-dwelling men, but not in women. **Clin Chem Lab Med.** v. 52, n.2, p. 289-95. 2014.

MYERS, M. G., JR. *et al.* Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. **Trends Endocrinol Metab.** v. 21, n.11, p. 643-51. 2010.

NAKA, Y. *et al.* RAGE axis: Animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 24, n.8, p. 1342-9. 2004.

NAKAMURA, K. *et al.* Serum levels of sRAGE, the soluble form of receptor for advanced glycation end products, are associated with inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. **Mol Med.** v. 13, n.3-4, p. 185-9. 2007a.

NAKAMURA, K. *et al.* Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetic subjects with coronary artery disease. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 23, n.5, p. 368-71. 2007b.

NAKAMURA, K. *et al.* Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are positively associated with circulating AGEs and soluble form of VCAM-1 in patients with type 2 diabetes. **Microvasc Res.** v. 76, n.1, p. 52-6. 2008a.

NAKAMURA, K. *et al.* Circulating advanced glycation end products (AGEs) and soluble form of receptor for AGEs (sRAGE) are independent determinants of serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 24, n.2, p. 109-14. 2008b.

NANDISH, S.; OLIVEROS, R.; CHILTON, R. Keeping your arteries young: vascular health. **J Clin Hypertens (Greenwich).** v. 13, n.10, p. 706-7. 2011.

NAZIR, N. *et al.* Meta-analysis of diabetic nephropathy associated genetic variants in inflammation and angiogenesis involved in different biochemical pathways. **BMC Med Genet.** v. 15, n.1, p. 103. 2014.

NCBI. **dbSNP Short Genetic Variations.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs5393. Acesso em: 23/09/2013.

NEEPER, M. *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem.** v. 267, n.21, p. 14998-5004. 1992.

NENTWICH, M. M.; ULBIG, M. W. Diabetic retinopathy - ocular complications of diabetes mellitus. **World J Diabetes.** v. 6, n.3, p. 489-99. 2015.

NICOLUCCI, A.; BUSEGHIN, G.; DE PORTU, S. Short-term cost analysis of complications related to glycated hemoglobin in patients with type 1 diabetes in the Italian setting. **Acta Diabetol.** v. p. 2015.

NISHIZAWA, Y.; KOYAMA, H. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products and cardiovascular disease in end-stage renal disease. **J Ren Nutr.** v. 18, n.1, p. 76-82. 2008.

NORATA, G. D. *et al.* Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with body mass index and waist/hip ratio in the general population. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** v. 19, n.2, p. 129-34. 2009.

NORTON, L. *et al.* Chromatin occupancy of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) and its role in hepatic glucose metabolism. **Diabetologia**. v. 54, n.12, p. 3132-42. 2011.

OMIM. **Online Mendelian Inheritance in Man**. Disponível em: <<http://www.omim.org/>>. Acesso em: 07/02/14.

ONUMA, H. *et al.* The GCKR rs780094 polymorphism is associated with susceptibility of type 2 diabetes, reduced fasting plasma glucose levels, increased triglycerides levels and lower HOMA-IR in Japanese population. **J Hum Genet**. v. 55, n.9, p. 600-4. 2010.

ORHO-MELANDER, M. *et al.* Common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. **Diabetes**. v. 57, n.11, p. 3112-21. 2008.

OSWAL, A.; YEO, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. **Obesity (Silver Spring)**. v. 18, n.2, p. 221-9. 2010.

OTT, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biol**. v. 2, p. 411-29. 2014.

PAGAN, A. *et al.* A gene variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. v. 180, p. 77-82. 2014.

PAPADOPOULOU, A. *et al.* Gestational diabetes mellitus is associated with TCF7L2 gene polymorphisms independent of HLA-DQB1*0602 genotypes and islet cell autoantibodies. **Diabet Med**. v. 28, n.9, p. 1018-27. 2011.

PAPPA, K. I. *et al.* Gestational diabetes mellitus shares polymorphisms of genes associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Greek population. **Gynecol Endocrinol**. v. 27, n.4, p. 267-72. 2011.

PARK, I. H. *et al.* Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. **Molecular Immunology**. v. 40, n.16, p. 1203-11. 2004.

PARK, L. *et al.* Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. **Nat Med**. v. 4, n.9, p. 1025-31. 1998.

PEDRINELLI, R. *et al.* Hypertension and acute myocardial infarction: an overview. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)**. v. 13, n.3, p. 194-202. 2012.

PEETERS, S. A. *et al.* Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. **Cardiovasc Diabetol**. v. 14, p. 31. 2015.

PENA, G. *et al.* Leptin Receptor Gene Gln223Arg Polymorphism Is Not Associated with Hypertension: A Preliminary Population-Based Cross-Sectional Study. **Cardiol Res Pract**. v. 2014, p. 879037. 2014.

PETERS, T.; AUSMEIER, K.; RUTHER, U. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. **Mamm Genome**. v. 10, n.10, p. 983-6. 1999.

PETRY, C. J. Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment. **British Journal of Nutrition**. v. 104, n.06, p. 775-787. 2010.

PHILLIPS, C. M. *et al.* Leptin receptor polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to augment risk of insulin resistance and metabolic syndrome in adults. **J Nutr**. v. 140, n.2, p. 238-44. 2010.

PICCOLI, G. B. *et al.* Is renal hyperfiltration protective in chronic kidney disease-stage 1 pregnancies? A step forward unravelling the mystery of the effect of stage 1 chronic kidney disease on pregnancy outcomes. **Nephrology (Carlton)**. v. 20, n.3, p. 201-8. 2015.

PICHETH, G. *et al.* The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. **Clin Chem Lab Med**. v. 45, n.10, p. 1268-72. 2007a.

PICHETH, G. *et al.* The -429 T>C polymorphism of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is associated with type 1 diabetes in a Brazilian population. **Clin Chim Acta**. v. 383, n.1-2, p. 163-4. 2007b.

PIGNATELLI, M. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. **J Cell Sci**. v. 114, n.Pt 22, p. 4117-26. 2001.

PINHAS-HAMIEL, O.; ZEITLER, P. Clinical presentation and treatment of type 2 diabetes in children. **Pediatr Diabetes**. v. 8 Suppl 9, p. 16-27. 2007.

PINO, M. F. *et al.* Glucokinase thermolability and hepatic regulatory protein binding are essential factors for predicting the blood glucose phenotype of missense mutations. **J Biol Chem**. v. 282, n.18, p. 13906-16. 2007.

PLUTZKY, J. Macrovascular effects and safety issues of therapies for type 2 diabetes. **Am J Cardiol**. v. 108, n.3 Suppl, p. 25B-32B. 2011.

POLLIN, T. I. *et al.* Triglyceride response to an intensive lifestyle intervention is enhanced in carriers of the GCKR Pro446Leu polymorphism. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 96, n.7, p. E1142-7. 2011.

PRASAD, K. Low levels of serum soluble receptors for advanced glycation end products, biomarkers for disease state: myth or reality. **Int J Angiol**. v. 23, n.1, p. 11-6. 2014.

QI, Q. *et al.* Association of GCKR rs780094, alone or in combination with GCK rs1799884, with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population. **Diabetologia**. v. 52, n.5, p. 834-43. 2009.

QIAO, Q. *et al.* Age- and sex-specific prevalence of diabetes and impaired glucose regulation in 11 Asian cohorts. **Diabetes Care**. v. 26, n.6, p. 1770-80. 2003.

QUEIROZ, E. M. *et al.* IGF2, LEPR, POMC, PPARG, and PPARGC1 gene variants are associated with obesity-related risk phenotypes in Brazilian children and adolescents. **Braz J Med Biol Res**. v. p. 0. 2015.

RACITI, G. A. *et al.* Understanding type 2 diabetes: from genetics to epigenetics. **Acta Diabetol**. v. p. 2015.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med.** v. 50, n.5, p. 567-75. 2011.

RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. **Amino Acids.** v. 42, n.4, p. 1151-61. 2012.

RANTHE, M. F. *et al.* A Detailed Family History of Myocardial Infarction and Risk of Myocardial Infarction - A Nationwide Cohort Study. **Plos One.** v. 10, n.5, p. e0125896. 2015.

RAPOSEIRAS-ROUBIN, S. *et al.* Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels: New Roles for Soluble RAGE. **Eur J Heart Fail.** v. 12, n.10, p. 1092-100. 2010.

RAUCCI, A. *et al.* A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). **FASEB J.** v. 22, n.10, p. 3716-27. 2008.

REWERS, M. Challenges in diagnosing type 1 diabetes in different populations. **Diabetes Metab J.** v. 36, n.2, p. 90-7. 2012.

REYNOLDS, K. *et al.* Prevalence of Tobacco Use and Association between Cardiometabolic Risk Factors and Cigarette Smoking in Youth with Type 1 or Type 2 Diabetes Mellitus. **J Pediatr.** v. p. 2010.

ROBITAILLE, J.; GRANT, A. M. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. **Genet Med.** v. 10, n.4, p. 240-50. 2008.

ROJAS, A.; FIGUEROA, H.; MORALES, E. Fueling inflammation at tumor microenvironment: the role of multiligand/RAGE axis. **Carcinogenesis.** v. 31, n.3, p. 334-41. 2010.

ROSA, R. *et al.* Estimated hospitalizations attributable to diabetes mellitus within the public healthcare system in Brazil from 2008 to 2010: study DIAPS 79. **Rev Assoc Med Bras.** v. 60, n.3, p. 222-30. 2014.

ROSA, R. S.; SCHMIDT, M. I. Diabetes mellitus: magnitude das hospitalizações na rede pública do Brasil, 1999-2001. **Epidemiol. Serv. Saúde.** v. 17, n.2, p. 4. 2008.

ROSHAN, B.; STANTON, R. C. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. **J Nephropathol.** v. 2, n.4, p. 234-240. 2013.

RYCKMAN, K. K. *et al.* Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **BJOG.** v. 122, n.5, p. 643-51. 2015.

SACKS, D. B. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem.** v. 57, n.6, p. e1-e47. 2011.

SALOPURO, T. *et al.* Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study. **Int J Obes (Lond).** v. 29, n.10, p. 1245-51. 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANCHEZ-PULIDO, L.; ANDRADE-NAVARRO, M. A. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. **BMC Biochem.** v. 8, p. 23. 2007.

SANGHERA, D. K. *et al.* TCF7L2 polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Khatri Sikhs from North India: genetic variation affects lipid levels. **Ann Hum Genet.** v. 72, n.Pt 4, p. 499-509. 2008.

SANGHERA, D. K. *et al.* Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. **BMC Med Genet.** v. 9, p. 59. 2008.

SATTAR, N.; GILL, J. M. Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? **BMC Med.** v. 12, p. 123. 2014.

SAXENA, R. *et al.* Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. **Diabetes.** v. 55, n.10, p. 2890-5. 2006.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira em Hipertensão Arterial. . **Arq Bras Cardiol.** v. 89, n.3, p. e24-79. 2007.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015.** Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/images/pdf/diretrizes-sbd.pdf>>. Acesso em: 12 jan 2015.

SCHAEFER-GRAF, U. M. *et al.* Maternal lipids as strong determinants of fetal environment and growth in pregnancies with gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 31, n.9, p. 1858-63. 2008.

SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan(R) assay. In. **Methods Mol Biol**, 2011. p.77-87.

SCHLUETER, C. *et al.* Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing? **Biochim Biophys Acta.** v. 1630, n.1, p. 1-6. 2003.

SCHMIDT, A. M. *et al.* Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. **J Biol Chem.** v. 267, n.21, p. 14987-97. 1992.

SCHMIDT, A. M. *et al.* The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **J Clin Invest.** v. 108, n.7, p. 949-55. 2001.

SCOTT, L. J. *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science.** v. 316, n.5829, p. 1341-5. 2007.

SCOTT, R. A. *et al.* The link between family history and risk of type 2 diabetes is not explained by anthropometric, lifestyle or genetic risk factors: the EPIC-InterAct study. **Diabetologia.** v. 56, n.1, p. 60-9. 2013.

SCUTERI, A. *et al.* Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. **PLoS Genet.** v. 3, n.7, p. e115. 2007.

SEMBA, R. D. *et al.* Elevated serum advanced glycation end products and their circulating receptors are associated with anaemia in older community-dwelling women. **Age Ageing**. v. 38, n.3, p. 283-9. 2009.

SEOK, H. *et al.* 1,5-anhydroglucitol as a useful marker for assessing short-term glycemic excursions in type 1 diabetes. **Diabetes Metab J**. v. 39, n.2, p. 164-70. 2015.

SHAAT, N. *et al.* Genotypic and phenotypic differences between Arabian and Scandinavian women with gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**. v. 47, n.5, p. 878-84. 2004.

SHAAT, N. *et al.* A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**. v. 50, n.5, p. 972-9. 2007.

SHOKOUHI, S. *et al.* Association of rs7903146, rs12255372, and rs290487 polymorphisms in TCF7L2 gene with type 2 diabetes in an Iranian Kurdish ethnic group. **Clin Lab**. v. 60, n.8, p. 1269-76. 2014.

SHU, L. *et al.* Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. **Hum Mol Genet**. v. 18, n.13, p. 2388-99. 2009.

SHU, L. *et al.* Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. **Diabetes**. v. 57, n.3, p. 645-53. 2008.

SIMMONS, K. M.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes: A predictable disease. **World J Diabetes**. v. 6, n.3, p. 380-90. 2015.

SINGH, R. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP-9 and MMP-2) gene polymorphisms influence allograft survival in renal transplant recipients. **Nephrol Dial Transplant**. v. 25, n.10, p. 3393-401. 2010.

SKRHA, J., JR. *et al.* Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and EN-RAGE to endothelial dysfunction in type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 120, n.5, p. 277-81. 2012.

SLUIJS, I. *et al.* A Mendelian randomization study of circulating uric acid and type 2 diabetes. **Diabetes**. v. p. 2015.

SMEMO, S. *et al.* Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. **Nature**. v. 507, n.7492, p. 371-5. 2014.

SMITH-PALMER, J. *et al.* Assessment of the association between glycemic variability and diabetes-related complications in type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 105, n.3, p. 273-84. 2014.

SOLAK, M. *et al.* Association of obesity with rs1421085 and rs9939609 polymorphisms of FTO gene. **Mol Biol Rep**. v. 41, n.11, p. 7381-6. 2014.

SON, S. M. Reactive oxygen and nitrogen species in pathogenesis of vascular complications of diabetes. **Diabetes Metab J**. v. 36, n.3, p. 190-8. 2012.

SPARSO, T. *et al.* The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. **Diabetologia**. v. 51, n.1, p. 70-5. 2008.

SPOSITO, A. C. *et al.* [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. **Arq Bras Cardiol.** v. 88 Suppl 1, p. 2-19. 2007.

STEHOUWER, C. D. *et al.* Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. **Diabetes.** v. 51, n.4, p. 1157-65. 2002.

STERENCZAK, K. A.; NOLTE, I.; MURUA ESCOBAR, H. RAGE splicing variants in mammals. **Methods Mol Biol.** v. 963, p. 265-76. 2013.

STERN, M. P.; HAFFNER, S. M. Body fat distribution and hyperinsulinemia as risk factors for diabetes and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis.** v. 6, n.2, p. 123-30. 1986.

STUEBE, A. M. *et al.* Maternal genotype and gestational diabetes. **Am J Perinatol.** v. 31, n.1, p. 69-76. 2014.

SUGAYA, K. *et al.* Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. **Genomics.** v. 23, n.2, p. 408-19. 1994.

SWAMINATHAN, A. *et al.* What is the lower limit for postprandial venous plasma glucose in healthy young adults? **Ann Clin Biochem.** v. 50, n.Pt 6, p. 614-7. 2013.

SYMEONIDIS, C. *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP-2, -9) and tissue inhibitor (TIMP-1, -2) activity in tear samples of pediatric type 1 diabetic patients: MMPs in tear samples from type 1 diabetes. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.** v. 251, n.3, p. 741-9. 2013.

TABARA, Y. *et al.* Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. **Diabetes.** v. 58, n.2, p. 493-8. 2009.

TABASSUM, R. *et al.* Common variants of IL6, LEPR, and PBEF1 are associated with obesity in Indian children. **Diabetes.** v. 61, n.3, p. 626-31. 2012.

TAI, N.; WONG, F. S.; WEN, L. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. **Rev Endocr Metab Disord.** v. 16, n.1, p. 55-65. 2015.

TAKEDA, J. *et al.* Structure/function studies of human beta-cell glucokinase. Enzymatic properties of a sequence polymorphism, mutations associated with diabetes, and other site-directed mutants. **J Biol Chem.** v. 268, n.20, p. 15200-4. 1993.

TAMBO, E. *et al.* Surveillance-response systems: the key to elimination of tropical diseases. **Infect Dis Poverty.** v. 3, p. 17. 2014.

TARTAGLIA, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell.** v. 83, n.7, p. 1263-71. 1995.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T. S. *et al.* Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c level. **Diabetes Care.** v. 23, n.12, p. 1830-4. 2000.

TENNEKON, K. H. *et al.* LEPR c.668A>G polymorphism in a cohort of Sri Lankan women with pre-eclampsia / pregnancy induced hypertension: a case control study. **BMC Res Notes**. v. 5, p. 308. 2012.

TESAROVA, P. *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE)--soluble form (sRAGE) and gene polymorphisms in patients with breast cancer. **Cancer Investigation**. v. 25, n.8, p. 720-5. 2007.

TESSIER, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. **Pathol Biol (Paris)**. v. 58, n.3, p. 214-9. 2010.

THOMAS, M. C. *et al.* Soluble receptor for AGE (RAGE) is a novel independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. **Diabetologia**. v. 54, n.10, p. 2669-77. 2011.

THOMPSON, D. B. *et al.* Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. **Hum Mol Genet**. v. 6, n.5, p. 675-9. 1997.

THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. **Amino Acids**. v. 25, n.3-4, p. 275-81. 2003.

THRAILKILL, K. M. *et al.* Disease and gender-specific dysregulation of NGAL and MMP-9 in type 1 diabetes mellitus. **Endocrine**. v. 37, n.2, p. 336-43. 2010.

TODD, J. A. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. **Immunol Today**. v. 11, n.4, p. 122-9. 1990.

TOK, E. C. *et al.* PPAR-gamma2 Pro12Ala polymorphism is associated with weight gain in women with gestational diabetes mellitus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. v. 129, n.1, p. 25-30. 2006.

TOUSOULIS, D.; KAMPOLI, A. M.; STEFANADIS, C. Diabetes mellitus and vascular endothelial dysfunction: current perspectives. **Curr Vasc Pharmacol**. v. 10, n.1, p. 19-32. 2012.

TRICHES, C. *et al.* [Macrovascular diabetic complications: clinical characteristics, diagnosis and management]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 53, n.6, p. 698-708. 2009.

TUSIE LUNA, M. T. Genes and type 2 diabetes mellitus. **Arch Med Res**. v. 36, n.3, p. 210-22. 2005.

TYAGI, S. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **J Adv Pharm Technol Res**. v. 2, n.4, p. 236-40. 2011.

UKPDS. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Lancet**. v. 352, n.9131, p. 837-53. 1998.

VALIZADEH, M. *et al.* The risk factors and incidence of type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome in women with previous gestational diabetes. **Int J Endocrinol Metab**. v. 13, n.2, p. e21696. 2015.

VAN SCHAFTINGEN, E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. **Eur J Biochem.** v. 179, n.1, p. 179-84. 1989.

VAN SCHAFTINGEN, E.; VEIGA-DA-CUNHA, M.; NICULESCU, L. The regulatory protein of glucokinase. **Biochem Soc Trans.** v. 25, n.1, p. 136-40. 1997.

VAN ZOELLEN, M. A. *et al.* Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. **Shock.** v. 31, n.3, p. 280-4. 2009.

VARGA, T.; CZIMMERER, Z.; NAGY, L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. **Biochim Biophys Acta.** v. 1812, n.8, p. 1007-22. 2011.

VIANA, L. V. *et al.* Poor glycaemic control in Brazilian patients with type 2 diabetes attending the public healthcare system: a cross-sectional study. **BMJ Open.** v. 3, n.9, p. e003336. 2013.

VIAZZI, F. *et al.* Serum uric acid and its relationship with metabolic syndrome and cardiovascular risk profile in patients with hypertension: insights from the I-DEMAND study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** v. 24, n.8, p. 921-7. 2014.

VISSING, H. *et al.* Localization of the human gene for advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) to chromosome 6p21.3. **Genomics.** v. 24, n.3, p. 606-8. 1994.

WALCZAK, R.; TONTONNOZ, P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. **J Lipid Res.** v. 43, n.2, p. 177-86. 2002.

WALKER, J. J. Pre-eclampsia. **Lancet.** v. 356, n.9237, p. 1260-5. 2000.

WANG, C. *et al.* Quantitative assessment of the influence of PPARG P12A polymorphism on gestational diabetes mellitus risk. **Mol Biol Rep.** v. 40, n.2, p. 811-7. 2013.

WANG, H. *et al.* Large scale meta-analyses of fasting plasma glucose raising variants in GCK, GCKR, MTNR1B and G6PC2 and their impacts on type 2 diabetes mellitus risk. **Plos One.** v. 8, n.6, p. e67665. 2013.

WANG, J. *et al.* Association of rs7903146 (IVS3C/T) and rs290487 (IVS3C/T) polymorphisms in TCF7L2 with type 2 diabetes in 9,619 Han Chinese population. **Plos One.** v. 8, n.3, p. e59053. 2013.

WANG, L. *et al.* Association of MMP-9 gene polymorphisms with acute coronary syndrome in the Uygur population of China. **World J Emerg Med.** v. 2, n.2, p. 104-10. 2011.

WANG, L. *et al.* Variant rs1421085 in the FTO gene contribute childhood obesity in Chinese children aged 3-6 years. **Obes Res Clin Pract.** v. 7, n.1, p. e14-22. 2013.

WANGNOO, S. K. Initiating insulin therapy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. **Indian J Endocrinol Metab.** v. 19, n.Suppl 1, p. S68-70. 2015.

WARD, C.; LEWIS, S.; COLEMAN, T. Prevalence of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy and impact on birth weight: retrospective study using Millennium Cohort. **BMC Public Health.** v. 7, p. 81. 2007.

WARNER, J. P. *et al.* Human glucokinase regulatory protein (GCKR): cDNA and genomic cloning, complete primary structure, and chromosomal localization. **Mamm Genome**. v. 6, n.8, p. 532-6. 1995.

WAUTIER, J. L.; SCHMIDT, A. M. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. **Circ Res**. v. 95, n.3, p. 233-8. 2004.

WEISZ, B. *et al.* Elevated serum uric acid levels in gestational hypertension are correlated with insulin resistance. **Am J Perinatol**. v. 22, n.3, p. 139-44. 2005.

WHITE, J. M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol**. v. 15, n.5, p. 598-606. 2003.

WHITING, D. R. *et al.* IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 94, n.3, p. 311-21. 2011.

WHO. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation**. Geneva: World Health Organization, 2000.

WHO. Guidelines for the prevention, management and care of diabetes mellitus. **Geneva World Health Organization**. v. p. 1-82. 2009.

WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. World Health Organization.

Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf. Acesso em: 10 março 2015.

WIKSTROM, A. K.; STEPHANSSON, O.; CNATTINGIUS, S. Tobacco use during pregnancy and preeclampsia risk: effects of cigarette smoking and snuff. **Hypertension**. v. 55, n.5, p. 1254-9. 2010.

WILLI, C. *et al.* Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**. v. 298, n.22, p. 2654-64. 2007.

WILMOT, E.; IDRIS, I. Early onset type 2 diabetes: risk factors, clinical impact and management. **Ther Adv Chronic Dis**. v. 5, n.6, p. 234-44. 2014.

WINICK, J. D.; STOFFEL, M.; FRIEDMAN, J. M. Identification of microsatellite markers linked to the human leptin receptor gene on chromosome 1. **Genomics**. v. 36, n.1, p. 221-2. 1996.

WON, J. C. *et al.* 1,5-Anhydroglucitol reflects postprandial hyperglycemia and a decreased insulinogenic index, even in subjects with prediabetes and well-controlled type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 84, n.1, p. 51-7. 2009.

WU, H. D. *et al.* Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study. **Genet Test Mol Biomarkers**. v. 17, n.9, p. 707-12. 2013.

XAVIER, H. T. *et al.* V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**. v. 101 Supl 1, p. 1-22. 2013.

XI, B.; MI, J. FTO polymorphisms are associated with obesity but not with diabetes in East Asian populations: a meta-analysis. **Biomed Environ Sci**. v. 22, n.6, p. 449-57. 2009.

- YAMAGISHI, S. *et al.* Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochim Biophys Acta**. v. 1820, n.5, p. 663-71. 2012.
- YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H. RAGE-Mediated Inflammation, Type 2 Diabetes, and Diabetic Vascular Complication. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 4, p. 105. 2013.
- YAMANOUCHI, T. *et al.* Plasma 1,5-anhydro-D-glucitol as new clinical marker of glycemic control in NIDDM patients. **Diabetes**. v. 38, n.6, p. 723-9. 1989.
- YAMANOUCHI, T. *et al.* Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. **Am J Physiol**. v. 263, n.2 Pt 1, p. E268-73. 1992.
- YANG, Y. Wnt signaling in development and disease. **Cell Biosci**. v. 2, n.1, p. 14. 2012.
- YASMIN *et al.* Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 26, n.8, p. 1799-805. 2006.
- YE, S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. **Cardiovasc Res**. v. 69, n.3, p. 636-45. 2006.
- YEO, G. S.; O'RAHILLY, S. Uncovering the biology of FTO. **Mol Metab**. v. 1, n.1-2, p. 32-6. 2012.
- YI, F.; BRUBAKER, P. L.; JIN, T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. **J Biol Chem**. v. 280, n.2, p. 1457-64. 2005.
- YIANNAKOURIS, N. *et al.* The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 86, n.9, p. 4434-9. 2001.
- YONEKURA, H. *et al.* Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochem J**. v. 370, n.Pt 3, p. 1097-109. 2003.
- YONEKURA, H. *et al.* Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. **J Pharmacol Sci**. v. 97, n.3, p. 305-11. 2005.
- YOO, T. W. *et al.* Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circ J**. v. 69, n.8, p. 928-33. 2005.
- YU, H.; QI, X.; WANG, X. Application of glycated hemoglobin in the perinatal period. **Int J Clin Exp Med**. v. 7, n.12, p. 4653-9. 2014.
- ZEGGINI, E. *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. **Science**. v. 316, n.5829, p. 1336-41. 2007.
- ZENG, S. *et al.* Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. **J Hepatol**. v. 50, n.5, p. 929-36. 2009.
- ZHANG, C. *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. **Diabetes**. v. 55, n.9, p. 2645-8. 2006.

ZHANG, L. *et al.* Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. **J Biol Chem.** v. 283, n.51, p. 35507-16. 2008.

ZHANG, Q. *et al.* Predicting of disease genes for gestational diabetes mellitus based on network and functional consistency. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 186, p. 91-6. 2015.

ZHANG, X. *et al.* A1C level and future risk of diabetes: a systematic review. **Diabetes Care.** v. 33, n.7, p. 1665-73. 2010.

ZHANG, Y. *et al.* Evaluation of two screening methods for undiagnosed diabetes in China: an cost-effectiveness study. **Prim Care Diabetes.** v. 7, n.4, p. 275-82. 2013.

ZHOU, Y. *et al.* TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing. **Hum Mol Genet.** v. 23, n.24, p. 6419-31. 2014.

ZHU, P. *et al.* Involvement of RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways in AGEs-induced MMP-9 activation in HaCaT keratinocytes. **Exp Dermatol.** v. 21, n.2, p. 123-9. 2012.

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) de diabéticos e controles

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Mauren Isfer Anghebem Oliveira e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente com diabetes atendido no Serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado "Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional", que vai pesquisar a presença de formas solúveis desse receptor no seu sangue. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes e ainda conhecer os fatores que levam o paciente diabético a ter maior ou menor risco para complicações vasculares, como o pé diabético, a cegueira e o infarto do coração.
- b) Caso você participe da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico) serão repassados para os pesquisadores pelo seu médico. Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.
- c) O sangue será coletado durante o procedimento de coleta de rotina do serviço da Unidade de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR), após sua consulta médica, sem necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitos indivíduos como o Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional, 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o diabetes, 3) novas associações entre a presença das formas do receptor que pretendemos estudar e as complicações do diabetes. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o diabetes e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.
- i) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Mauren Isfer Anghebem Oliveira (mauren.isfer@ufpr.br) e Geraldo Picheth (gpicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento no serviço de Endocrinologia Diabética, que está assegurado.
- k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como seu médico. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados no próprio serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- n) Caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, você terá o direito de saber ou se recusar a saber o resultado.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item "e". Em relação ao item "o", eu _____ (desejo/ não desejo) saber os resultados/descobertas feitas referentes à pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Mauren Isfer Anghebem Oliveira e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, que veio ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado "Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional", que vai pesquisar a presença de formas solúveis desse receptor no seu sangue. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- o) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes e ainda conhecer os fatores que levam o paciente diabético a ter maior ou menor risco para complicações vasculares, como o pé diabético, a cegueira e o infarto do coração.
- p) Caso você participe da pesquisa, vamos anotar seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura). Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.
- q) O sangue será coletado seguindo normas bem estabelecidas, no serviço da Unidade de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).
- r) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue. Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.
- s) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitos indivíduos como o Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional, 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o diabetes, 3) novas associações entre a presença das formas do receptor que pretendemos estudar e as complicações do diabetes. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- t) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o diabetes e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- u) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.
- v) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Mauren Isfer Anghebem Oliveira (mauren.isfer@ufpr.br) e Geraldo Picheth (gpicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- w) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará afetar a sua doação de sangue, que está assegurado.
- l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como o médico do serviço. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados no serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- o) Caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, você terá o direito de saber ou se recusar a saber o resultado.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item "e". Em relação ao item "o", eu _____ (desejo/ não desejo) saber os resultados/descobertas feitas referentes à pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – Formulário para coleta de dados dos participantes

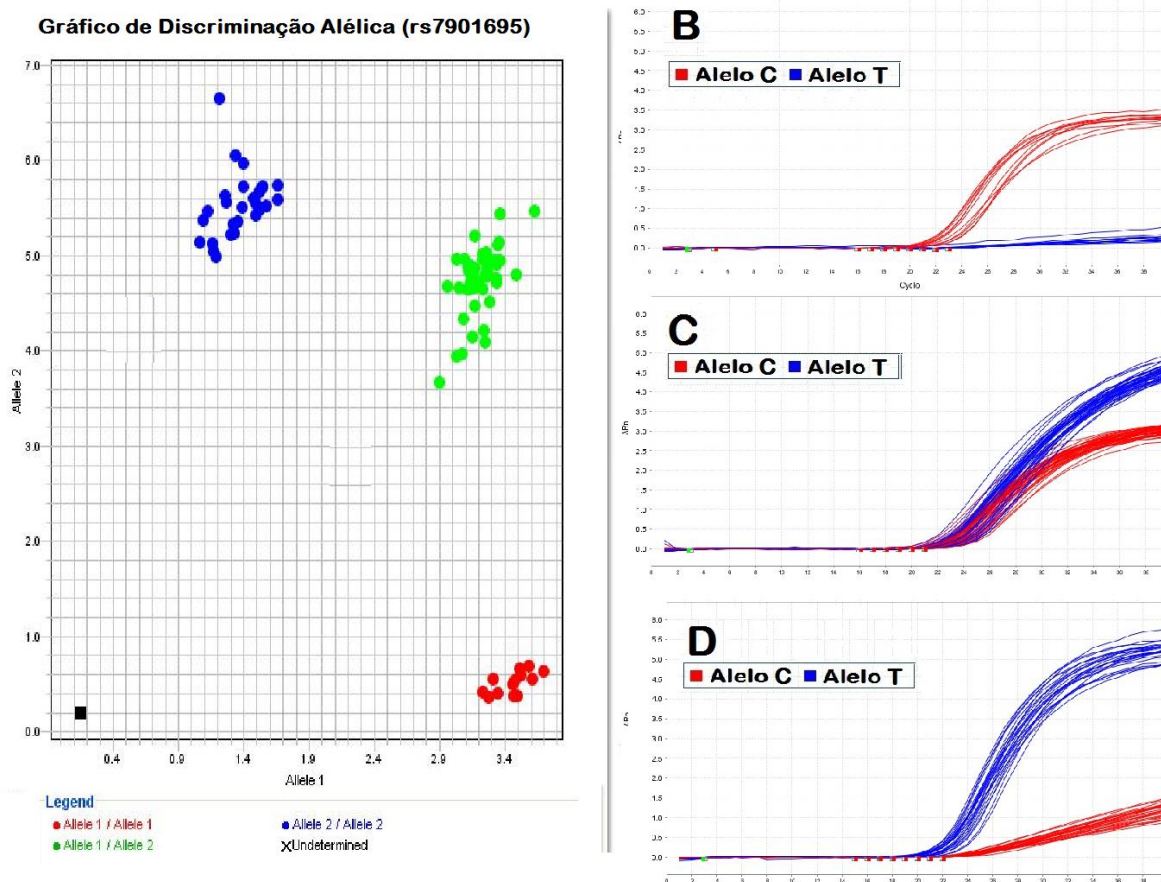
Planilha de coleta de dados:

Caracterização do Paciente		Data
Registro HC:		/ /
Nome:		

Dados clínicos

N	Dados	Obs.
1	Idade	[] anos
2	Peso	[] kg
3	Altura	[] cm
4	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental
5	Tipo de Diabetes	(1)= Tipo 1 (2)= Tipo 2 Tempo do início do DM; anos
6	Pressão Arterial (PA)	[] / [] mmHg Medicamentos para pressão:
7	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
8	Histórico Obesidade	(1)= Sim (2)= Não pessoal
9	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não Quais:
10	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
11	História familiar de Doença Tireoideana	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
12	Medicamentos:	<u>Descrever:</u> <u>Hipolipemiante</u> <u>Tireóide</u> <u>Hipoglicemiante:</u> <u>Insulina:</u>
13	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: Creatinina Microalbuminúria: TSH: aTG aTPO Outros:
14	Outras patologias:	Doenças Autoimunes: (1)= Sim (2)= Não
15	Outras observações	

ANEXO 3 – Exemplo de detecção de polimorfismos por PCR em tempo real (rs7901695 do gene *TCF7L2*)



A) Gráfico de discriminação alélica: em vermelho estão amostras homozigotas (genótipo CC); em verde, amostras heterozigotas (genótipo CT) e em azul, amostras homozigotas (genótipo TT). B) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo CC; verifica-se a amplificação somente do alelo A (vermelho). C) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo CT; verifica-se a amplificação de ambos os alelos, C e T. D) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo TT; verifica-se a amplificação somente do alelo T (azul).

ANEXO 4 – Análise do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para os polimorfismos em estudo

Grupos Caso-Controle	Genes	Polimorfismos	P (equilíbrio H-W)	
			Controles	Casos
DM1 + Controles	<i>MMP9</i>	rs17576	0,797	0,634
	<i>RAGE</i>	rs3134945	0,309	0,588
DM2 + Controles	<i>MMP9</i>	rs17576	0,114	0,431
	<i>RAGE</i>	rs3134945	0,805	0,872
DMG + Controles	<i>FTO</i>	rs1421085	0,237	0,535
	<i>GCKR</i>	rs780094	0,094	0,207
	<i>LEPR</i>	rs1137100	0,741	0,187
	<i>LEPR</i>	rs1137101	0,239	0,220
	<i>PPARg</i>	rs1801282	0,723	0,185
	<i>TCF7L2</i>	rs7901695	0,212	0,219

Controles: participantes saudáveis. Casos: participantes afetados pela patologia em estudo.
P, probabilidade para Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* calculado com o programa DeFinetti
(<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Uma probabilidade (P) menor que 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa.

ANEXO 5 – Sumário dos estudos de associação entre isoformas solúveis de RAGE e complicações vasculares em pacientes com DM2

Sumário dos estudos de associação entre isoformas solúveis de RAGE e complicações vasculares em pacientes com DM2.

Isoformas	Condição/ Patologia	Amostras	Resultados	Desfecho do estudo	Ref
sRAGE	DM2 e DAC	Caso: 75 japoneses com DM2. Controle: 75 japoneses, pareados por sexo e idade, saudáveis.	Média e desvio sRAGE (pg/mL): Caso: $965,3 \pm 544,2$ Controle: $415 \pm 150,4$	Concentrações de sRAGE foram mais elevadas no DM2, e positivamente associadas à DAC.	(NAKAMURA <i>et al.</i> , 2007b)
sRAGE e esRAGE	DM2 e doenças cardio-vasculares	Caso: 167 pacientes com DM2 que desenvolveram evento cardiovascular durante o estudo. Controle: 551 pacientes com DM2 que não desenvolveram evento cardiovascular durante o estudo.	Mediana esRAGE (ng/mL): Caso: 0,330 (0,240 – 0,460) Controle: 0,330 (0,240 – 0,430) Mediana e variação sRAGE (pg/mL): Caso: 1404 (1097– 1877) Controle: 1404 (1057–1777)	Concentrações aumentadas de sRAGE e esRAGE plasmáticos foram associados com incidência de doença coronariana, mas não com infarto em pacientes com DM2.	(COLHOUN <i>et al.</i> , 2011)
esRAGE	DM2, síndrome metabólica e aterosclero-se	Caso: 203 diabéticos. Controle: 134 não diabéticos.	Média e desvio esRAGE (ng/mL): Diabéticos: $0,176 \pm 0,092$ Não diabéticos: $0,262 \pm 0,110$	Os indivíduos com DM2 e intolerância a glicose apresentaram concentrações reduzidas de esRAGE, e inversamente associadas com aterosclerose e componentes severos da síndrome metabólica.	(KOYAMA <i>et al.</i> , 2005)
esRAGE	DM2 e restenose intra-stent	Grupo I: 205 chineses com DM2 sem DAC. Grupo II: 128 chineses com DM2 e DAC sem RIS. Grupo III: 86 DM2 com DAC e RIS. Controle: 152 indivíduos saudáveis com idade ≥ 45 anos, sem histórico de DM2 e/ou DAC.	Média e desvio esRAGE (ng/mL): Grupo I: $0,30 \pm 0,11$ Grupo II: $0,22 \pm 0,11$ Grupo III: $0,16 \pm 0,08$ Controle: $0,48 \pm 0,13$	Concentrações reduzidas de esRAGE foram associadas com restenose intra-stent em chineses com DM2.	(LU, L. <i>et al.</i> , 2008)
esRAGE	DM2, inflamação e rigidez arterial	Caso: 76 coreanos com DM2 (43 homens e 33 mulheres; idade $55,7 \pm 9,3$ anos). Controle: 78 coreanos saudáveis (42 homens e 36 mulheres; idade $57 \pm 8,5$ anos).	Média e desvio esRAGE (ng/mL): Diabéticos: $0,237 \pm 0,123$ Controle: $0,307 \pm 0,177$	Pacientes com DM2 tiveram concentrações menores de esRAGE quando comparados aos controles, e as concentrações foram associadas com inflamação e rigidez arterial, processos envolvidos na aterosclerose.	(CHOI, K. M. <i>et al.</i> , 2009)

esRAGE	DM2 e nefropatia diabética	Grupo I: 39 japoneses com DM2 sem nefropatia diabética (29 homens e 10 mulheres; idade $62,2 \pm 12,5$ idade). Grupo II: 47 japoneses com DM2 com nefropatia diabética (35 homens e 12 mulheres; idade $62,5 \pm 11,9$). Grupo III: 21 japoneses com DM2 em diálise (14 homens e 07 mulheres; idade $65 \pm 10,7$).	Média e desvio esRAGE (pg/mL) Grupo I: $185,6 \pm 101,6$ Grupo II: $333,1 \pm 217,7$ Grupo III: $801,4 \pm 666,0$	As concentrações de esRAGE foram associadas com a severidade e duração da disfunção renal em pacientes DM2. Pacientes DM2 em diálise apresentaram concentrações maiores que de pacientes com DM2 com nefropatia sem diálise ou sem nefropatia.	(GOHDA <i>et al.</i> , 2008)
--------	----------------------------	---	--	--	------------------------------

AGE, produtos finais de glicação avançada; CV, Coeficiente de variação; DAC, Doença Arterial Coronariana; DCV, Doenças Cardiovasculares; DM1, Diabetes tipo 1; DM2, Diabetes tipo 2; esRAGE, RAGE solúvel endógeno secretório (formado por *splicing*); IAM, infarto agudo do miocárdio; RAGE, receptor para AGE; RIS, Restenose Intra-Stent; sRAGE, RAGE solúvel.

ANEXO 6 – Comprovante de submissão para a *Revista Panamericana de Salud Pública*

Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health - Manuscript

↑ ↓ ×

ID/Número de manuscrito 2015-00254



contacto_rpsp@paho.org (contacto_rpsp@paho.org)

Para: rego@ufpr.br, mauren_isfer@hotmail.com

Dear Prof. Rego:

Your manuscript entitled "O Banco de sangue na triagem do diabetes: uma alternativa válida?" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health.

Your manuscript ID is 2015-00254.

ANEXO 7 – Comprovante de submissão para o Jornal *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

Fwd: Your manuscript ID CCLM.2015.0483 - submission confirmation

----- Mensagem encaminhada -----

De: "cclm editorial" <cclm.editorial@degruyter.com>

Para: rego@ufpr.br

Assunto: Your manuscript ID CCLM.2015.0483 - submission confirmation

Dear Prof. Rego,

Your manuscript entitled "Non-Fasting Glucose Reference Interval in Blood Donors" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).

Your manuscript ID is CCLM.2015.0483.